

ZUR IMMUNSUPPRESSIVEN WIRKUNG DES VINCRISTINSULFATS

**Versuche an Mäusen im Hinblick auf die
präoperative Chemotherapie von
primär operablen Wilms-Tumoren**

Christian Göpfert

1973

AUS DER KINDERCHIRURGISCHEN KLINIK
Direktor: Prof. Dr. W. Hecker
und

AUS DER ABTEILUNG FÜR ANTIMIKROBIELLE THERAPIE
Abt.-Leiter: Prof. Dr. W. Marget
der
PÄDIATRISCHEN KLINIK
Direktor: Prof. Dr. K. Betke
in der

UNIVERSITÄTS-KINDERKLINIK
im
DR. v. HAUNERSCHEN KINDERSPITAL in MÜNCHEN

ZUR IMMUNSUPPRESSIVEN WIRKUNG DES VINCRISTINSULFATS

Versuche an Mäusen im Hinblick auf die präoperative
Chemotherapie von primär operablen Wilms-Tumoren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christian Göpfert
aus Göppingen/Württemberg

München 1973



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Prof. Dr. W. Marget
Korreferent:	Prof. Dr. W. Hecker
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 31.7.1973

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr.med. Ilse Coerdts, Leiterin der Abteilung für pädiatrische plastische Chirurgie, und Herrn Professor Dr.med. Walter Marget, Leiter der Abteilung für antimikrobielle Therapie - beide an der Universitätskinderklinik München - für die Überlassung des interessanten Themas und für die stete Anteilnahme und die äußerst wohlwollende Förderung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr.med.vet. Bruno Schiefer, damals veterinärpathologisches Institut der Universität München, bin ich zu großem Dank verpflichtet für die selbstverständliche Hilfsbereitschaft, mit der er und seine Mitarbeiter viele der Mäuse eingehend untersuchten.

Herrn Priv. Doz. Dr.med. Benno Stampfl, Chefarzt des pathologischen Instituts des Städt. Krankenhauses München-Harlaching danke ich sehr dafür, daß er mir die Anfertigung der histologischen Präparate ermöglichte.

Weiterhin schulde ich herzlichen Dank den Herren von der Münchener Vertretung der Firma Leitz/Wetzlar für die kostenlose Anfertigung der Mikrophotographien.

Fräulein Dürr und Herrn Zahn, beide Tierpfleger an der I. Universitätsfrauenklinik in München, bin ich sehr dankbar für ihre Mithilfe und Beratung bei der Beschaffung und Betreuung der Versuchstiere und ihre Hilfe bei den Äthernarkosen.

A. Einleitung.....	1
I.Bisherige Ergebnisse.....	1
II.Problemstellung.....	4
B. Materialien und Versuchsmethodik.....	7
I.Materialien.....	7
a.Vincristinsulfat.....	7
b.Versuchstiere.....	8
II.Versuchsmethodik.....	10
a.Transplantationstechnik.....	10
b.Immunreaktion v.Spättyp.....	19
c.Immunreaktion v.Soforttyp.....	21
d.Leuko-,Thrombo-zyten u.Gewicht...	24
III.Zeitpunkte d.Vincristingaben.....	25
C. Ergebnisse.....	26
I.Transplantationsversuch.....	26
II.Immunantwort v.Spättyp.....	29
III.Immunantwort v.Soforttyp.....	29
IV.Leuko-,Thrombo-zyten u.Gewicht....	36
V.Zusammenfassung d.Ergebnisse.....	38
D. Diskussion.....	39
I.Zur Versuchsmethodik.....	39
II.Zur Antigenität d.Wilms-Tumors....	40
a.Spez.Immuntoleranz b.Wilms-Tu?...	40
b.Experimentelle Ergebnisse.....	41
III.Z.immunosuppr.Wirkg.v.Vincristin..	42
IV.Leuko-,Thrombo-zyten u.Gewicht....	45
E. Schlußfolgerungen.....	47
F. Zusammenfassung.....	49
G. Literaturverzeichnis.....	51

A.EINLEITUNG

I.Bisherige Ergebnisse

Verschiedene Autoren weisen seit längerem eindringlich darauf hin, daß die Prognose der Erkrankung am Wilms-Tumor neben anderen Faktoren - z.B. dem Alter des Tumorträgers, dem Zeitraum bis zum Behandlungsbeginn, dem Metastasierungsgrad - wesentlich dadurch beeinflußt wird, ob es gelingt, durch diagnostische Maßnahmen und Operation verursachte Metastasierungen infolge von in die Blutbahn ausgeschwemmten, vitalen Tumorzellen zu verhindern (5, 6, 7, 16, 19, 23, 30, 37, 42, 46). Dies wird unter anderem - z.B. schonende Diagnostik, verfeinerte Operationstechnik mit frühzeitiger Unterbindung des Nierengefäßstiemes, prä- und/oder postoperative Verabreichung von Bestrahlungen - durch prä-, intra- oder postoperative Gabe von Zytostatika zu erreichen versucht, auch deshalb, weil eine "Chemoprophylaxe" (6) im Gegensatz zur "Strahlenprophylaxe" bei besseren Ergebnissen weniger schwerwiegende Spätschäden zu verursachen scheint (29, 31, 35, 41). Actinomycin D und Vincristinsulfat haben sich bei der Behandlung des Wilms-Tumors bisher am besten bewährt.

Welcher Zeitpunkt für den Beginn der Chemoprophylaxe am günstigsten sei, darüber gehen die Meinungen sehr auseinander. Im Wesentlichen werden drei Ansichten vertreten:

1. Beginn der Chemoprophylaxe schon beim Verdacht auf ein Nephroblastom unter Inkaufnahme einer möglichen Fehldiagnose (38, 46),
 2. Beginn unmittelbar vor oder während der Operation (3, 4, 6, 7, 16, 19, 23, 30), oder
 3. Tage bis mehrere Wochen nach der Operation (43).
- BURGERT und GLIDEWELL (3) berichten aus ihrem Krankengut von 122 Kindern mit Wilms-Tumor über zwei verschieden behandelte Gruppen: 29 (63%) von 49 mit Actinomycin D behandelten Patienten überlebten mehr als vier Jahre, während nur 16 (44%) von 36 Kindern, die kein Actinomycin D zu-

sätzlich zu Operation und Bestrahlung erhalten hatten, vier Jahre nach der Nephrektomie noch am Leben waren (alle Patienten hatten zur Zeit der Operation keine nachweisbaren Metastasen). Die Gruppe der 49 mit Actinomycin D behandelten Kinder wird weiter aufgeschlüsselt: von den 27 Patienten, bei denen mit der zytostatischen Therapie am Operationstag begonnen wurde, waren nach vier Jahren noch 24 (89%) am Leben; während von den acht, bei denen diese Therapie am Tag vor der Operation begann, nur vier (50%) und von denen, die das Mittel erst im Laufe der ersten Woche nach der Operation erhielten, fünf (35%) von 14 vier Jahre danach noch lebten.

FARBER (7) beobachtete bei 47 (89%) von 53 Kindern mit Wilms-Tumoren, die zum Zeitpunkt der Klinikaufnahme frei von Metastasen waren und bei denen gleichzeitig mit der Operation mit der Gabe von Actinomycin D begonnen wurde, eine Zweijahresheilung, im Gegensatz zu der bis dahin erreichbaren Heilungsrate von etwa 40% durch Operation und Bestrahlung allein.

Keine Verbesserung der Therapieergebnisse sahen zwei andere Autorengruppen:

SUKAROHANA und KIESEWETTER (38) erzielten bei 21 Patienten die nur mit Nephrektomie und Nachbestrahlung behandelt worden waren, eine Zweijahresheilungsrate von 61,9% (ohne genaue Angaben über Krankheitsstadium oder Metastasierungsgrad), von 16 Patienten, die zusätzlich, sobald als die Diagnose eines Wilms-Tumors vermutet wurde, Actinomycin D bekamen, waren 62,5% nach zwei Jahren rezidivfrei und am Leben.

MAIER und HARSHAW (zit. n. 30) behandelten 24 Kinder mit Wilms-Tumoren nur mit Nephrektomie und Bestrahlungen, von diesen überlebten 54% rezidivfrei die nächsten zwei Jahre; von 17 Patienten, bei denen gleichzeitig mit der postoperativen Bestrahlung oder beim Auftreten erster Metastasen mit einer zusätzlichen Actinomycin D-Behandlung begonnen wurde, also mehrere Tage bis Wochen nach der Operation, konnten nur

29% nach zwei Jahren als geheilt gelten.

Auf Grund dieser Arbeiten scheint es für den Erfolg der Actinomycin D-Behandlung beim Nephroblastom von ausserordentlich grosser Bedeutung zu sein, daß es am Tag der Operation erstmals verabreicht wird. Beginnt man mit der zytostatischen Therapie früher oder später, resultiert anscheinend keine signifikante Besserung der Behandlungsergebnisse. Auch KARRER(16) und RUFEN(30) vertreten diese Ansicht.

Von Mitgliedern der PEDIATRIC DIVISION OF THE SOUTHWEST CANCER CHEMOTHERAPY STUDY GROUP(39-45, 47) und anderen(12,54) wird das Vincristinsulfat wegen seiner schnellen und guten Wirkung als für die Rezidivprophylaxe beim Wilms-Tumor geeignet beschrieben. Besonders SULLIVAN, SUTOW, VIETTI et al. beobachteten einen außerordentlich schnellen und drastischen Wirkungseintritt(39-45,47). Es wird z.B. von einem dreijährigen Mädchen berichtet, das mit einem fast das ganze linke Abdomen ausfüllenden Wilms-Tumor und röntgenologisch nachgewiesenen Lungenmetastasen zur Aufnahme kam. Zunächst erhielt es in wöchentlichen Abständen Vincristin(0,05 mg/kg). Vier Tage nach der ersten Dosis war der Tumor im Abdomen um über die Hälfte verkleinert, nach zehn Tagen waren auch alle multiplen Lungenmetastasen nicht mehr nachweisbar. Am elften Tag wurde die Nephrektomie durchgeführt, anschließend Bestrahlungen und Weiterführung der Vincristintherapie bis zur Gesamtzahl von zwölf der genannten Dosen. 21 Monate nach Therapiebeginn war das Kind ohne nachweisbares Tumorwachstum(40).

Inzwischen empfehlen mehrere Autoren die Anwendung von Vincristinsulfat beim Wilms-Tumor(11, 12,14-19,25,33,39-45,47,51,52,54).

Auch die vergleichsweise geringe Knochenmarkstoxizität(20,24,28,54) ist bei einer präoperativen Anwendung vorteilhaft.

Es wird allerdings auch darauf hingewiesen, daß, ähnlich wie andere Malignome, auch der Wilms-Tu-

mor zur Resistenzentwicklung gegen Vincristin neigt und deshalb für eine Langzeittherapie Actinomycin D geeigneter sei(16,39).

II. Problemstellung

Die eingangs beschriebenen Erfahrungen mit dem Actinomycin D und die daraus gezogene Schlußfolgerung(S.3 oben)sind sicher nicht ohne weiteres auf das Vincristin übertragbar,bei dem, da es erst seit 1962 beim Wilms-Tumor eingesetzt wird(Actinomycin D seit 1954)mangels ausreichend großer Serien entsprechende Vergleiche noch nicht möglich sind.Die im Folgenden angestellten,theoretischen Überlegungen,warum die richtige Wahl des Zeitpunktes,an dem mit der Chemoprophylaxe begonnen wird,für deren Erfolg ausschlaggebend sein kann,dürften für beide Zytostatika zutreffend sein:

Es kann angenommen werden,daß Metastasen der Wirkung von Zytostatika umso schlechter zugänglich werden,je mehr sie eine gewisse"kritische" Größe überschritten haben(7,30).Am sichersten werden wahrscheinlich die Tumorzellen vernichtet, die noch frei in der Blutbahn zirkulieren. Es leuchtet deshalb ohne weiteres ein,warum ein zu später,postoperativer Beginn der Chemotherapie schlechte Ergebnisse zeitigt.

Warum bei zu frühem,präoperativem Beginn der zytostatischen Therapie ebenfalls schlechtere Behandlungsergebnisse erzielt wurden(3,30,38), ist zunächst nicht verständlich,einleuchtend wäre es doch vielmehr,wenn bei Prophylaxebeginn sofort nach Diagnosestellung mit längerem Zwischenraum bis zur Operation eine merkliche Vergrößerung des Anteils geheilter Patienten beobachtet würde,denn dann müßten die intraoperativ ausgeschwemmten Tumorzellen bereits so vorgeschädigt sein,daß bei den bestehenden zytostatischen Blut- und Gewebsspiegeln eine durch diese Zellen verursachte Metastasierung umso sicherer verhindert würde

Da dies nicht zutrifft,muß es einen oder mehrere körpereigene Faktoren geben,die eine star-

ke Wirkung gegen Wilms-Tumorzellen besitzen, deren Wirkung aber durch kurzdauernde Einwirkung von Actinomycin D bereits so abgeschwächt wird, daß das Actinomycin D allein die iatrogen induzierte Entstehung von Fernmetastasen nicht verhindern kann.

Wenn auch letzte schlüssige Beweise dafür noch ausstehen und gerade beim Wilms-Tumor die Umstände diesbezüglich besonders schwierig zu sein scheinen (siehe Teil D, II), könnten auf Grund der bisher vorliegenden Befunde die intakten Immunsysteme für die eben beschriebene Wirkung verantwortlich sein (13, 21, 32, 53, 55).

Ausgehend von dieser Arbeitshypothese müßten demnach am Operationstermin unbeeinträchtigte Immunsysteme mit ausreichenden Zytostatikaspiegeln zusammenwirken können, damit für die kleinen Patienten größtmöglicher Schutz gegen die intraoperativ ausgeschwemmten Tumorzellen erreicht wird. Da Vincristinsulfat und Actinomycin D starke Immunsuppressiva sind, wäre es deshalb wichtig zu wissen, wie lange nach Beginn einer zytostatischen Therapie - in unserem Fall mit Vincristin - eine merkliche Immunsuppression eintritt; mit anderen Worten: wie groß der Abstand zwischen der ersten Vincristininjektion und der Unterbindung des Nierengefäßstieles sein darf.

Auf Anregung von COERDT und MARGET sollte deshalb tiereperimentell untersucht werden, wie verschiedene Immunsysteme nach einer Vincristindosis, die in ihrer Höhe therapeutischen Dosen entspricht, im Zeitablauf von drei Tagen beeinflusst werden. Zu diesem Zweck sollten die Versuchstiere, analog dem bei den Tumorträgern präoperativ bestehenden Zustand, in immunologische Modellsituationen versetzt werden, die es erlauben würden, die Beeinflussung künstlich erzeugter Immunreaktionen vom Sofort- und vom Spättyp und der Transplantatabstoßungsreaktion durch die Vincristinverabreichung in sinnvoller Weise zu beobachten.

Um zusätzlich Anhaltspunkte für die Beeinflussung der Knochenmarksfunktion und des Gesamtstoffwechsels zu gewinnen, sollten während vier Tagen nach einer entsprechenden Vincristindosis die Leukozyten- und Thrombozytenzahlen und das Gewicht beobachtet werden.

B.MATERIALIEN UND VERSUCHSMETHODIK

I.Materialien

a.VINCRISTINSULFAT

Es kam die unter dem Namen Vincristin Lilly in Stechampullen zu je ein Milligramm verpackte, handelsübliche Substanz zur Anwendung. Entsprechend dem Vorgehen anderer Untersucher(1,2,27, 28) wurde das Mittel den Mäusen intraperitoneal (i.p.) in einer Konzentration von ein mg/100 ml steriler, physiologischer Kochsalzlösung verabreicht. Die Lagerungsvorschriften des Herstellers wurden genau beachtet.

Bei allen Versuchen wurde die für die Anwendung beim Menschen zulässige Maximaldosis(51,52) von 0,150 mg/kg Körpergewicht einmalig verabreicht. An den Mäusen konnten bei dieser Dosierung äußerlich keinerlei Veränderungen beobachtet werden; auch zehnfach höhere, einmalige Dosen wurden von ihnen ohne ausgeprägte Krankheitssymptome toleriert. Am Applikationsort konnten bei der Konzentration von ein mg/100 ml keine Nekrosen nachgewiesen werden.

Das Vincristin ist eines der vier Alkaloide, die aus dem auf den Antillen vorkommenden Immergrünengewächs *Vinca rosea* L. isoliert werden konnten (NOBLE et al. und davon unabhängig JOHNSON et al. 1958-60). Mit ihm liegt eine asymmetrische, dimere Verbindung vor, ein Indol-Indolin-Alkaloid, das sich von seinen drei Verwandten (Vinblastin, Vinleurosine und Vinrosidine) lediglich in der mit dem Stickstoffatom der Dihydroindolgruppe verbundenen Seitenkette unterscheidet (s. Abb. 1).

Seine zytostatische Wirkung wird ähnlich wie beim Colchicin hauptsächlich der in vitro und in vivo beobachteten Arretierung sich teilender Zellen in der Metaphase zugeschrieben (20, 24, 48-50, 52).

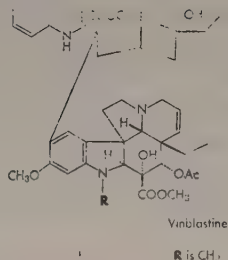


Abb.1:Die Strukturformeln von Vincristin und
Vinblastin(aus 52)

b.VERSUCHSTIERE

Es wurden Inzucht- und normale Labormäuse verwendet. Als Transplantatempfänger und zur Untersuchung der Leukozyten- und Thrombozytenzahlen und des Gewichts wurden Inzuchtmäuse des Stammes C 57/BL/6J/BOM ♂♂ mit schwarzem Fell und als Transplantatspender solche des Stammes AKR/A/BOM ♂♂ mit weißem Fell eingesetzt. (Lieferant: Fa. Gl. Bomholtgård, Dr. med. vet. Friis, 8680 Ry, Dänemark).

An je zehn Tieren von beiden Stämmen wurden zur Kontrolle der Histokompatibilität und der Transplantationstechnik homotope (Vollhaut)-Isotransplantationen durchgeführt. Dabei heilten alle Transplantate gut ein, nach drei Wochen waren sie von ihrer Umgebung nicht mehr zu unterscheiden (makroskopisch).

Bei jeder neuen Tiersendung wurden an willkürlich ausgewählten Mäusen zwei Kontrollen durchgeführt:

1. Sektion und histologische Untersuchung der wichtigsten inneren Organe im Pathologischen Institut der Tiermedizinischen Fakultät der Universität München zur Kontrolle des Gesundheitszustandes und

2. Bei je zwei Tieren die beschriebene Histokompatibilitätskontrolle.

Bei den in den Versuchen verwendeten Tiersendungen waren diese Kontrollen negativ.

Die Inzuchtmäuse waren sehr empfindlich, besonders gegen ungeeignetes Futter und Infizierung durch andere Tiere. Deshalb mußten sie in einem eigenen Raum gehalten werden, der vorher gründlich desinfiziert worden war. Um optimale Lebensbedingungen zu gewährleisten, wurden besondere Vorkehrungen getroffen: Keimarme Atemluft durch indirekte UV-Bestrahlung, gleichbleibende, thermostatgeregelte Raumtemperatur von 22-24° C, konstante Luftfeuchte von 50-60 rel.% und regelmäßige Scheuer- und Wischdesinfektionen des Raumes, der Möbel und Gerätschaften, der Luftbefeuchter und Ausgüsse und der Makrolon-Käfige und Käfiggestelle.

Neu angekommene Tiersendungen wurden neben den oben beschriebenen Kontrollen mindestens eine Woche lang von den bereits im Versuch befindlichen Mäusen getrennt gehalten und auf ihren Gesundheitszustand beobachtet, um die Einschleppung von Seuchen zu erschweren.

Die Tiere wurden mit Altromin-Trockenfutter und täglich erneuertem Leitungswasser ernährt, sie wogen zwischen 20 und 28 g. Es wurde Altromin-Einstreu verwendet.

Bei Vorversuchen hatte sich herausgestellt, daß bei NMRI ♀-Mäusen (Lieferant: Fa. Gassner, Otobrunn/München) eine humorale Immunität leichter zu erzeugen war, als bei Inzuchtmäusen. Sie wurden deshalb bei den entsprechenden Versuchen verwendet. Auch bei diesen Tieren wurden vor Versuchsbeginn die erwähnten Stichproben durchgeführt.

c. NARKOSEMITTEL

In Vorversuchen wurden die Narkotika Pentobarbital, Thiopental, Chloroform, Chloräthyl, Äther und Chloralhydrat auf ihre Wirkung und Verträglichkeit an C57/BL/6J/♂♂-Mäusen geprüft. Beur-

teilt wurden Narkosetiefe, Atemfrequenz, Muskelrelaxation, Narkosedauer und evtl. auftretende postnarkotische Komplikationen (z.B. Pneumonien). Zum Ausschluß einer schwereren Organtoxizität wurden je einmal Leber, Nieren und Lungen vom Tierpathologen histologisch untersucht. Pentobarbital und Thiopental erwiesen sich als zu wenig relaxierend, Chloräthyl und Chloroform als zu toxisch.

Eine mindestens eine halbe Stunde andauernde, praktisch nebenwirkungsfreie Narkose mit guter Relaxation wurde durch die Gabe von D, 36 g pro kg Körpergewicht einer 3,6%igen wässrigen Lösung von Chloralhydrat i.p. erreicht. In wässriger Lösung ist Chloralhydrat relativ instabil, seine Zerfallsprodukte sind toxisch. Es wurden deshalb nur frisch hergestellte Lösungen verwendet.

Da bei der Bestimmung der humoralen Antikörpertiter eine Serumverdünnung durch unmittelbar vor der Blutentnahme parenteral zugeführte Flüssigkeit vermieden werden sollte, wurde hier eine Ätherinhalationsnarkose durchgeführt.

II. Versuchsmethodik

a. TRANSPLANTATIONSTECHNIK

Nachdem die Mäuse mit Chloralhydrat narkotisiert worden waren, wurden zunächst mit einer elektrischen Haarschneidemaschine die Rückenhaare entfernt (s. Abb. 2). Eine möglicherweise das Ergebnis verfälschende Hautreizung oder -schädigung, wie sie bei Verwendung von Enthaarungscremes oder Rasierapparaten unvermeidlich gewesen wäre, trat so nicht auf.

Anschließend wurde unter sterilen Kautelen aus der Rückenmitte einer weißen AKR/A/BOM ♂♂-Maus ein im Durchmesser ca. 9 mm großer, runder Vollhautlappen entnommen und in bereitstehende, sterile 0,9%ige Kochsalzlösung gelegt. Dann wurde bei einer schwarzen C57/BL/6J/BOM ♂♂-Maus an orthotoper Stelle ein im Durchmesser ca. ein mm kleinerer, runder Vollhautlappen entnommen und

verworfen. In dem auf diese Weise geschaffenen Transplantatbett wurde das Transplantat mit locker geknüpften, atraumatischen Nähten so befestigt, daß die Wundränder genau adaptiert waren, jedoch keine Drucknekrosen entstanden. Um das Transplantat zu schützen, wurde mit selbstklebender Elastoplastbinde ein zirkulärer Verband angelegt, der den ganzen Körper mit Ausnahme des Kopfes und der vorderen und hinteren Extremitäten bedeckte. Im Transplantatbereich wurde in diesen Verband ein ausreichend großes Loch geschnitten, so daß Transplantat und Transplantatbett gut beurteilbar waren und die Abstoßungsreaktion durch den Verband nicht beeinflußt wurde. Vor Anlage dieses Verbandes war der Wundbereich durch einen dünn aufgesprayten Nobecutan-Film zusätzlich geschützt worden. Über das Beobachtungsluch wurde ein Hansaplastverband geklebt. So war gewährleistet, daß die Mäuse ihre eigenen Transplantate und die der anderen Tiere nicht beschädigen konnten, die Beurteilung der Abstoßungsreaktion jedoch - ohne die Gefahr einer Transplantatbeschädigung - durch Auswechseln der Hansaplastverbände leicht möglich war. (Lit. zur Transplantationstechnik: Billingham, R. u. P. Medawar in Brit. J. exp. Biol., 28:385 (1951); Billingham, R. et al. in Proc. roy. Soc., 143:43 (1954); Brent, L. in Progr. Allergy, 5:273 (1958).) Die Transplantate galten bei den vorliegenden Versuchen dann als abgestoßen, wenn sie sich von selbst begannen, vom Transplantatbett abzuheben und sich dann leicht und ohne Traumatisierung des umgebenden Gewebes vollständig ablösen ließen (vgl. Abb. 4 und 13 und Teil D, Abs. I).

Von einigen Erst- und Zweittransplantaten wurden - so gut es ging - in Paraffineinbettung histologische Präparate hergestellt und mit Häma-laun-Eosin gefärbt. Sie zeigen die primären und sekundären Abstoßungsphänomene von Erst- und Zweittransplantaten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transplantation (Abb. 5-14).



Abb.2:Enthaarung des Transplantationsgebietes

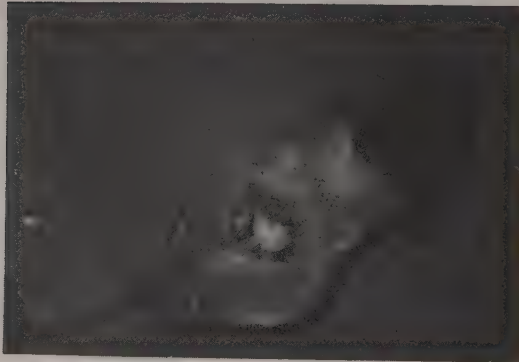


Abb.3:Ein Zweittransplantat am Tag nach der Transplantation.Zur Beurteilung ist hier das Hansaplastpflaster vom "Beobachtungsloch" abgenommen worden.(s.S.11)

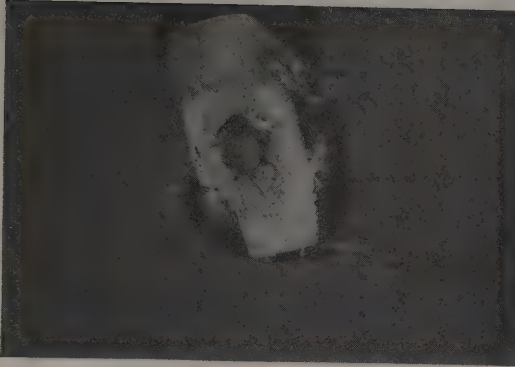


Abb.3a:Ein Ersttransplantat am zehnten Tag nach der Transplantation.Durch die Extravasatbildungen und die beginnende Nekrose hat das Transplantat eine rotbraune Farbe angenommen(vgl.Abb.3, 7 und 12).



Abb.4:Ein nach unserer Definition eben abgestoßenes Zweittransplantat(second set).Es ist völlig nekrotisch und läßt sich vom Transplantatbett abheben,ohne daß dort Bluttröpfchen als Zeichen einer Gewebsläsion entstehen würden(s. S.11 und Abb.13).

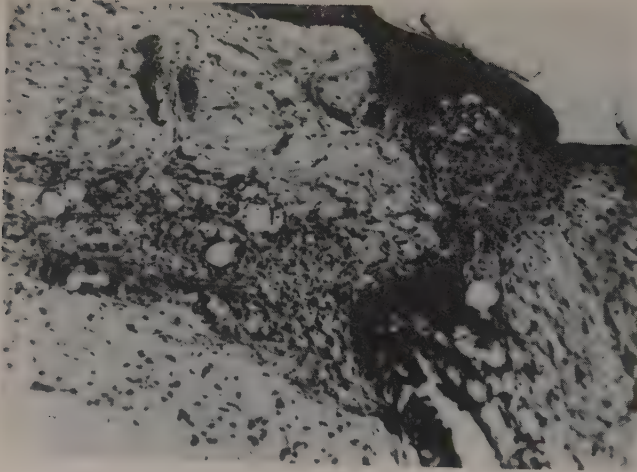


Abb.5:(Vergr.100:1)Primärphänomen am siebten Tag nach der Transplantation.An der Grenze zwischen Transplantat(links)und Transplantatbett (rechts)zellreiches Infiltrat,das sich in der Transplantatsubcutis fortsetzt.

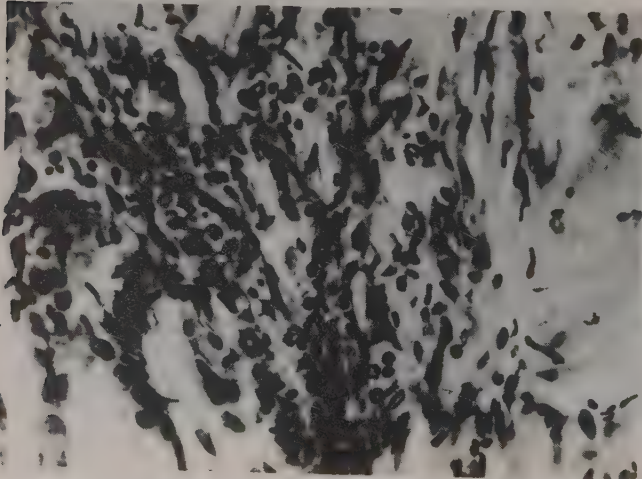


Abb.6:(Vergr.400:1)Ausschnitt aus dem Infiltrat eines typischen Primärphänomens,das hauptsächlich aus Lymphozyten,"mononukleären Zellen"(53) und nur zum kleinen Teil aus Plasmazellen und polymorphkernigen Leukozyten besteht.

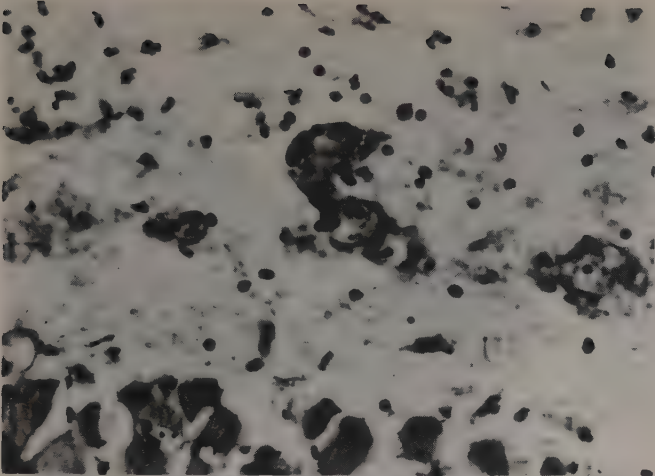


Abb.7:(Vergr.400:1)Primärphänomen am achten Tag:
In der Transplantatsubcutis prallgefüllte Kapillaren,mit zum Teil bereits zerstörten Gefäßwänden und eben stattfindender Extravasatbildung.Lockeres Infiltrat aus vorwiegend kleinen Lymphozyten im umgebenden Fettgewebe.

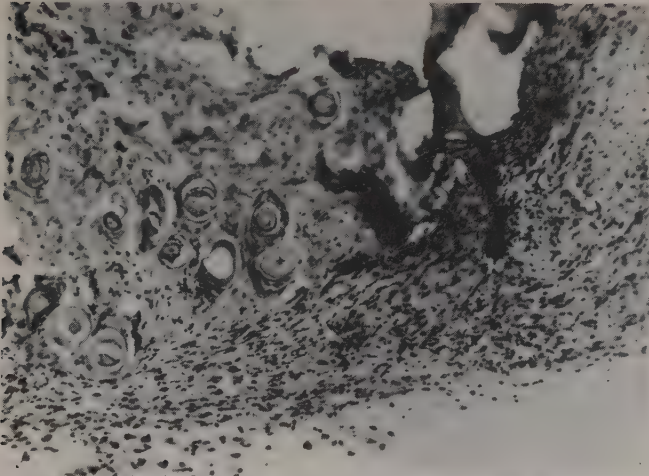


Abb.8:(Vergr.100:1)Primärphänomen am 13.Tag:
Wiederum das typische,das Transplantat(links) miteinbeziehende Infiltrat,das Transplantat selbst nekrotisch,die Epidermis abgeschilfert.In den maximal erweiterten Transplantatgefäßen runde, hyaline,geschichtete Körper- einige Tage zuvor entstandene Thromben.Etwas rechts der Bildmitte ein homogener,schwarzer Fleck:zufällig mitgeschnittenes Nahtmaterial,ohne Zeichen einer umgebenden Fremdkörperreaktion.Etwas rechts davon beginnt die Epidermis des Transplantatbettes das Transplantat zu unterwachsen.Bei der darüberliegenden,unscharfen Struktur handelt es sich um nekrotische,abgeschilferte Transplantat-Epidermis.

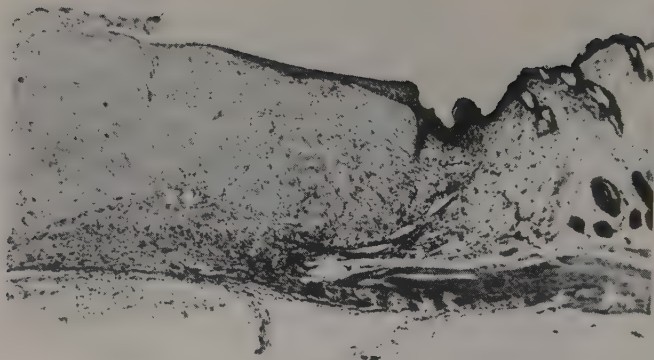


Abb.9:(Vergr.40:1)Primärphänomen am zwölften Tag: Transplantat bereits nekrotisch(links).Die Epidermis des Transplantatbettes überwächst von rechts her das Transplantat und dringt wie ein Keil zwischen Epidermis und Cutis vor.

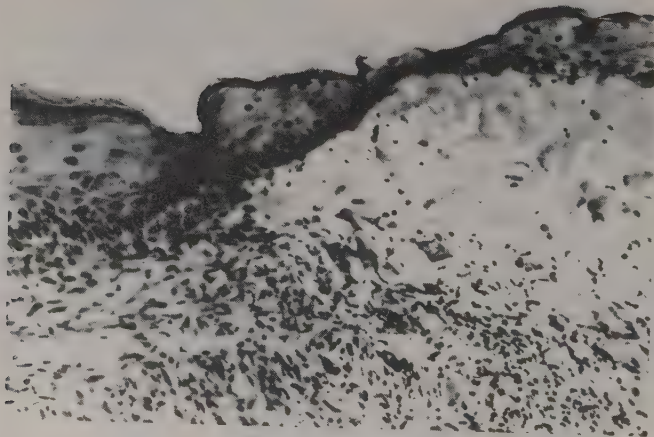


Abb.10:(Vergr.160:1)Sekundärphänomen am sechsten Tag:Durch die beschleunigte Abstoßung ist das Transplantat(rechts)mit Ausnahme der Epidermis bereits nekrotisch.Das zellreichere Infiltrat ist deutlicher auf das Transplantatbett begrenzt als beim Primärphänomen(vgl.Abb.5 u.8).



Abb.11:(Vergr.400:1) Ausschnitt aus dem typischen Infiltrat eines Sekundärphänomens: Vorwiegend Plasmazellen und polymorphkernige Leukozyten, relativ wenig Lymphozyten und "mononukleäre" Zellen (Vgl. Abb.6).

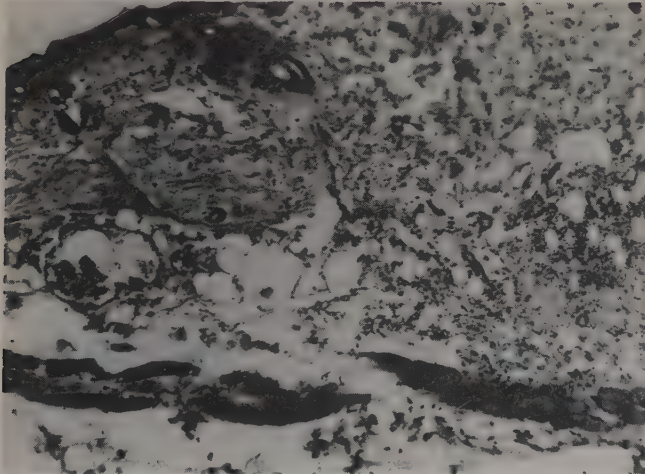


Abb.12:(Vergr.100:1) Sekundärphänomen am vierten Tag: In der Transplantatsubcutis massive, konfluierende Extravasate (untere Bildhälfte), das Infiltrat ist wesentlich weniger dicht als beim Primärphänomen (Abb.5,7 u.8).

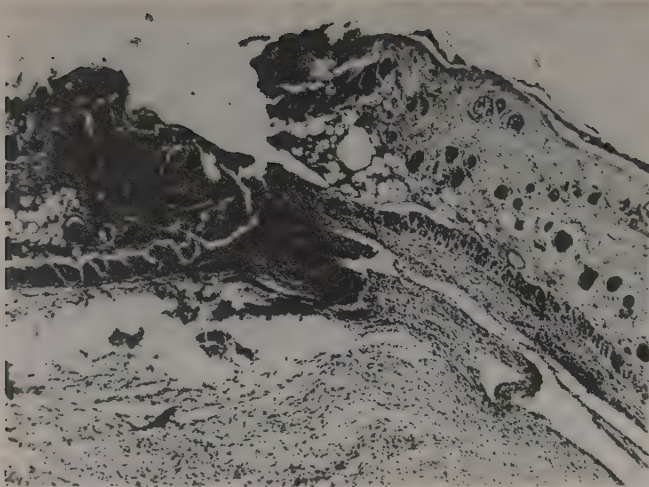


Abb.13:(Vergr.40:1)Zweittransplantat neun Tage nach der Transplantation:Das Transplantat ist im Sinne der von uns verwendeten Definition abgestoßen.Makroskopisch fiel bei diesem Präparat wie bei allen abgestoßenen Zweittransplantaten eine gallertige,glasige bis milchigtrübe Auflagerung auf der Unterseite auf,die bei diesem Schnitt am unteren Bildrand zu sehen ist.

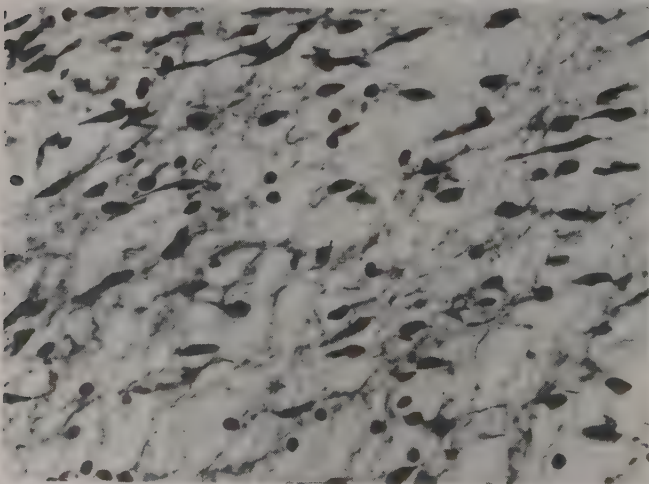


Abb.14:(Vergr.400:1)Eine Ausschnittsvergrößerung aus der bei Abb.13 beschriebenen,gallertigen Auflagerung zeigt H.E.-negative Grundsubstanz,durchsetzt von Fibroblasten und lymphoiden Zellen.

b.VERSUCHE ZUR STIMULIERUNG EINER IMMUNANTWORT VOM VERZÖGERTEN TYP

Es wurde versucht, mit 2,4-Dinitro-Fluor-Benzol (DNFB) jeweils an AKR/A/BOM ♂♂, C57/BL/6J/-BOM ♂♂ und an NMRI♀ eine Immunantwort vom Spättyp (sog. Überempfindlichkeit vom Spättyp, "delayed hypersensitivity") zu provozieren.

Das DNFB ist eine intensiv gelbe, stark toxische Flüssigkeit von öligter Konsistenz. Es ist in Wasser schlecht, in organischen Lösungsmitteln besser löslich. Sein Festpunkt liegt bei 24°C. Da DNFB ein Hapten ist (53,55), bedarf es der Kopplung an ein Protein, um seine antigene Wirkung entfalten zu können. Dementsprechend soll die zellulär vermittelte Immunantwort vom verzögerten Typ mit ihm am sichersten erzeugt werden können, wenn es auf eine vorher irritierte Hautfläche aufgebracht wird, oder wenn es in so hoher Konzentration angewandt wird, daß es selbst eine milde Hautirritation verursacht (53). In einer Reihe von Vorversuchen sollte zunächst methodisch hauptsächlich in Anlehnung an STEFFEN (55) untersucht werden, auf welche Weise diese Immunantwort vom Spättyp bei Mäusen mit DNFB am sichersten herstellbar und nachweisbar ist. Die Vorversuche im Einzelnen:

1. DNFB wurde in Konzentrationen von 0,005%, 0,01%, 0,05%, 0,1%, 1% und 5% in Mischungen von Aceton mit Olivenöl 4:1 und Aceton mit Maisöl aa gelöst. Damit wurden für die Antibiotikatestung übliche Testblättchen durchtränkt. Diese Antigenträger wurden mit Heftpflaster an der vorher enthaarten Bauchhaut der Mäuse fixiert (von jeder Rasse je zwei Tiere pro Konzentrationsstufe). Nach drei Tagen wurden sie wieder entfernt, dabei wurden bei den Tieren, die mit 1%igen und 5%igen Lösungen behandelt worden waren, toxische Reaktionen in Form von lokalen Ödemen und Erythemen beobachtet. Nach Ablauf von 4, 6, 10, 15 und 20 Tagen wurden auf der vorher enthaarten Rückenhaut zur Kontakttestung Testblättchen fixiert, die mit Lösungen von DNFB

in Aceton-Maisöl aa in Konzentrationen von 0,1% und 0,01% getränkt worden waren, Konzentrationen, bei denen es zu keinen toxisch bedingten, äußerlich sichtbaren Hautveränderungen gekommen war. Bei Sichtkontrollen im Abstand von je acht Stunden über einen Zeitraum von drei Tagen konnten keine Hautveränderungen beobachtet werden. Die Kontakttestung wurde an den gleichen Mäusen mit einer DNFB-Lösung in Aceton-Olivenöl 4:1 in den gleichen Konzentrationen wiederholt, ebenfalls ohne positive Ergebnisse.

2.Versuch: Jede der in Versuch 1 beschriebenen DNFB-Lösungen wurde in einer Einzeldosis von je 0,01 ml in die Sohlen aller vier Pfoten von jeweils zwei Mäusen pro Konzentrationsstufe intracutan injiziert (Gesamtmenge pro Maus: 0,04 ml). Die Kontakttestung wurde wie in Versuch 1 durchgeführt, ohne positives Ergebnis.

3.Versuch: Der einzige Unterschied zum 1.Versuch bestand darin, daß bei den Mäusen die Bauchhaut vor dem Auflegen der für die Sensibilisierung bestimmten Testblättchen mit Nadeln skarifiziert worden war, um einen möglichst innigen Kontakt zwischen Hautprotein und DNFB zu bewirken. Kontakttestung wie beschrieben, ohne positives Ergebnis.

4.Versuch: Es wurde eine 0,1%ige und eine 1%ige Lösung von DNFB in komplettem FREUND'schen Adjuvans (KFA) hergestellt und diese mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:1, 1:2, 1:4 und 1:10 durch Schütteln gründlich vermischt. Diese Emulsionen und die reinen DNFB-Lösungen in KFA wurden bei je drei Mäusen pro Konzentrationsstufe in Einzeldosen von je 0,01 ml in die Sohlen aller vier Pfoten intracutan injiziert. Bei je zwei dieser Mäuse erfolgte die Kontakttestung wie im 1.Versuch angegeben, bei der jeweils dritten Maus wurde mit 0,02 ml der 0,01%igen Lösung von DNFB in Aceton-Olivenöl 4:1 auf dem enthaarten Rücken eine intracutane Quaddel gesetzt. Auch hier kein positives Ergebnis.

5.Versuch: Bei diesem Versuch war der einzige Unterschied zu dem 4.Versuch der, daß je 0,1 ml

der genannten Emulsionen i.p.gegeben wurden. Auch hier blieben die Kontakttestungen ohne positives Ergebnis.

Die Versuche 3. und 4. wurden jeweils mindestens viermal in ihrem gesamten Ablauf wiederholt, ohne daß auch nur einmal bei der Kontakttestung (immer in den unter 1. beschriebenen Zeitabständen) eine entzündliche Hautveränderung hätte gesehen werden können.

Es war also nicht gelungen, mit DNFB nach den gängigen Methoden bei Mäusen eine Überempfindlichkeit vom Spättyp (delayed hypersensitivity) zu stimulieren (53,55). Der Versuch wurde hier abgebrochen.

c. VERSUCHE ZUR ERZEUGUNG EINER IMMUNANTWORT VOM SOFORTTYP

Um ein Antigen zu finden, das bei Mäusen vor allem hinsichtlich der Titerhöhe gut reproduzierbare humorale Immunreaktionen erzeugt, wurden C57/BL/6J/BOM ♂♂ und NMRI ♀ in Vorversuchen probeweise mit hitzeinaktivierten *Salmonella typhimurium*-, *S. paratyphi* A-, B-, C-, *Escherichia coli* O 18-Antigenen und *E. coli*-Mischantigenen immunisiert. Die höchsten und einheitlichsten Antikörpertiter ergaben sich bei NMRI ♀, die mit *E. coli* O 18 behandelt worden waren. Von diesem Antigen wurden drei verschiedene Aufbereitungen auf ihre Wirksamkeit geprüft: Das Lipopolysaccharidantigen (eine Stunde bei 124°C im Autoklaven, danach durch mehrfaches, scharfes Abzentrifugieren gereinigt), das hitzeinaktivierte Antigen (eine Stunde im Wasserbad auf 56°C erwärmt) und das formolinaktivierte Antigen. Die höchsten Titer wurden mit dem hitzeinaktivierten Antigen erzielt, das deshalb in diesem Versuch verwendet wurde.

Bei seiner Herstellung wurden zunächst die üblichen Agarnährböden möglichst gleichmäßig mittels einer Öse mit lebenden *E. coli* O18 beimpft. Nach 24-stündiger Bebrütung bei 37°C wurden mit den rasenartig die Platten bedeckenden Bakterien

in je fünf Millilitern steriler, physiologischer Kochsalzlösung Aufschwemmungen hergestellt, in einen sterilen Sammelkrug abgegossen, dann die Platten noch einmal mit je fünf Millilitern physiologischer Kochsalzlösung nachgespült und wieder in den Sammelkrug abgegossen. Mit der jeweils vierfachen Menge an 0,9%iger NaCl-Lösung - also 40 ml pro Petrischale - wurde diese Bakteriensuspension noch einmal verdünnt. Dann wurde sie in zwei Teile geteilt, mit dem einen wurde das hitzeinaktivierte Antigen für die Immunisierung, mit dem anderen das Lipopolysaccharidantigen für die passive Hämagglutinationsreaktion (Meßmethode bei der Antikörpertiterbestimmung) hergestellt. Das letztere wurde bis zu seiner Verwendung tiefgefroren.

Das hitzeinaktivierte Antigen wurde in einer Dosis von 0,1 ml 65 NMRI^Q-Mäusen i.p. injiziert. Diese reagierten ohne Ausnahme mit einem Schockzustand (Bewußtseinstrübung, Tachypnoe, Zyanose und krampfartiger Einziehung der Flanken), von dem sich alle bis auf sechs innerhalb weniger Stunden spontan wieder erholten.

In bestimmten Abständen vor und nach der Immunisierung wurden die Mäuse mit Vincristin behandelt (s. Teil C, Abschn. III).

20 Tage nach der Immunisierung wurde den Mäusen in Äthernarkose nach Eröffnung des Thorax aus dem schlagenden, linken Ventrikel soviel Blut wie möglich entnommen (zwischen 1,0 und 1,6 ml).

Die Höhe der Antikörpertiter wurde mit der passiven Hämagglutinationsreaktion (53,55) gemäß dem folgenden Schema bestimmt:

1. Humanerythrozyten der Blutgruppe O, Rhesusfaktor positiv, wurden mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt, bei 2500 Upm sieben Minuten lang zentrifugiert, und dann der Überstand vorsichtig abgekippt. Dieser Reinigungsvorgang wurde noch zweimal wiederholt.

2. Die durch Zentrifugieren (3000 Upm fünf Minuten lang) gewonnenen Mäuseseren wurden zur Komp-

lementinaktivierung im Wasserbad für eine halbe Stunde auf konstant 56°C erhitzt.

3. Mit den inaktivierten Mäuseseren und physiologischer Kochsalzlösung wurden in kleinen, un-ten runden Zentrifugengläschen geometrische Verdünnungsreihen von 1:5 bis 1:20.480 hergestellt.

4. Die nach 1. vorbehandelten Erythrozyten wurden mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:500 verdünnt.

5. Das frisch aufgetaute E.coli 018-Lipopolysaccharidantigen wurde zu gleichen Teilen mit der nach 4. hergestellten Humanerythrozytensuspension versetzt. Diese Mischung wurde, um die (Indikator-)Erythrozyten mit dem Antigen zu beladen, im Wasserbad für eine halbe Stunde auf konstant 37°C erwärmt. Zur Entfernung des Antigenüberschusses wurde sie danach drei Minuten lang bei 3000 Upm zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgekippt, und das Zentrifugat mit physiologischer Kochsalzlösung auf das vorherige Volumen wiederaufgefüllt. Dieser Vorgang wurde dreimal hintereinander ausgeführt.

6. Zu jedem Röhrchen der nach 3. hergestellten Serumverdünnungsreihe wurden 0,5 ml der nach 5. hergestellten Indikatorerythrozytensuspension zupipettiert.

7. Diese Gemische wurden im Wasserbad zur Beschleunigung der Antigen-Antikörperreaktion für eine halbe Stunde auf konstant 37°C erwärmt.

8. Anschließend wurden die Gläschen zwei Minuten lang bei 3000 Upm zentrifugiert, dabei sedimentierten die Erythrozyten zu einem kreisförmigen- oder ringförmigen, manchmal auch etwas gezackten Bodensatz.

9. Durch Schnipsen mit dem Fingernagel gegen das Gläschen wurde dieser Bodensatz aufgewirbelt. Blieben dabei schollige Verklumpungen bestehen, bedingt durch die Erythrozytenagglutination infolge der abgelaufenen Antigen-Antikörperreaktion, wurde das dem Gläschen entsprechende Verdünnungsverhältnis als positiver Wert gerechnet;

verteilte sich jedoch der Bodensatz gleichmäßig und fein im Überstand, wurde der diesem Gläschen entsprechende Wert nicht mehr gezählt.

10. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Spontanagglutinationen, die nicht durch die hier getestete Antigen-Antikörperreaktion zustande kamen, auszuschließen, wurde bei jeder Testreihe eine Antigen- und eine Serum-Kontrolle durchgeführt. Bei der Antigenkontrolle wurde die nach 5. präparierte Erythrozytensuspension statt mit einer Serumverdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt; bei der Serumkontrolle eine Serumverdünnung 1:5 mit der nach 4. behandelten Erythrozytensuspension. Abgelesen wurden die Kontrollen wie unter 9. beschrieben. Agglutinationen wurden bei ihnen nicht beobachtet.

d. LEUKOZYTEN, THROMBOZYTEN UND GEWICHT

Mit einer heparinisierten Glaskapillare wurde aus den Retroorbitalvenen das benötigte Mäuseblut entnommen. Durch Zug am Nackenfell direkt hinter den Ohren wurde das Gesichtsfell so gespannt, daß die Augen stecknadelkopfförmig hervortraten. Unter leichter Luxierung des Auges nach temporal wurde mit der Kapillare entlang des nasalen Augenrandes senkrecht in die Orbita vorgedrungen. Sowie dort ein leichter Widerstand fühlbar war, wurde durch sanften Druck unter leichter Drehung der Plexus venosus eröffnet, und die Kapillare konnte sich luftblasenfrei mit dem ausströmenden Blut füllen. Dieses wurde sofort anschließend - ebenfalls luftblasenfrei - bis zur Marke 1 in eine Leukozytenmischpipette (Assistent) umgefüllt. Zur Leukozytenzählung wurde es dann bis zur Marke 11 mit dreiprozentiger Essigsäure, zur Thrombozytenzählung mit einprozentiger Novocainlösung verdünnt und gründlich umgeschüttelt. Die Auszählung erfolgte mit der Neubauer-Zählkammer, die vor der Thrombozytenzählung mindestens eine halbe Stunde ruhen mußte.

Die Gewichte wurden mit einer Briefwaage (Meßbereich 0-100 g) bestimmt.

III. Die Zeitpunkte der Vincristingaben

Es sollte die Beeinflussung der verschiedenen Immunsysteme, der Leukozyten- und Thrombozytenzahlen und des Gewichtes durch eine Vincristingabe im Zeitraum von drei Tagen beobachtet werden. Folgende Zeitabstände zwischen Antigen- und Vincristinapplikation wurden bei den immunologischen Versuchen eingehalten: sechs Stunden, ein Tag (=24 Stunden), zwei Tage und drei Tage. Dabei sollte die Vincristingabe bei den Versuchstieren dem Beginn der Chemoprophylaxe bei den Tumorpatienten und die jeweilige Antigenapplikation der intraoperativ verstärkten Aussaat von Tumorzellen in die Blutbahn entsprechen. Da die Bildung von Antikörpern gegen die als Arbeitshypothese vorausgesetzten, spezifischen Antigene des Wilms-Tumors am Operationstermin bereits seit längerem stattfindet, denn die Antigenexposition der Patienten würde ja gleichzeitig mit dem Auftreten der Wilms-Tumoren beginnen, wurden bei den Transplantationsversuchen die Transplantatempfänger erst gegen das Gewebe der Spendertiere sensibilisiert. Dies wurde durch die Ersttransplantate erreicht, die nach durchschnittlich 14 Tagen abgestoßen wurden. Drei Wochen danach wurde durch Zweittransplantate die Aussaat der Tumorzellen imitiert. Das Vincristin wurde in den angegebenen Abständen vor der Zweittransplantation verabreicht, so daß sein Einfluß auf die Zeitdauer der Sekundärphänomene beobachtet wurde (s. Abb. 15).

Die Vincristinwirkung auf die Immunreaktion vom Soforttyp wurde an Tiergruppen beobachtet, die das Zytostatikum sowohl in den genannten Abständen vor der Immunisierung, als auch vor der 20 Tage danach erfolgten Blutentnahme erhalten hatten (s. Abb. 18).

Die Leukozyten- und Thrombozytenzahlen und das Gewicht wurden direkt vor und ein, zwei und drei Tage nach der Vincristingabe bestimmt.

C. ERGEBNISSE

I. Transplantationsversuch

Es wurden fünf Gruppen zu je sechs C57/BL/6J/-BOM ♂♂-Mäusen gebildet, die alle fünf Wochen zuvor durch Ersttransplantate ("first sets") gegen AKR/A/BOM ♂♂ sensibilisiert worden waren. Die einzelnen Gruppen unterschieden sich durch den Zeitabstand, in dem sie 0,150 mg Vincristinsulfat pro Kilogramm Körpergewicht (kg KG) vor der Zweittransplantation erhalten hatten:

Gruppenbezeichnung	Zeitabstand
A	6 Stunden
B	24 Stunden
C	2 Tage
D	3 Tage
K(ontrolle)	kein Vincristin

Tab.1: Einteilung des Transplantationsversuches in Gruppen nach dem Abstand zwischen Vincristingabe und Zweittransplantation.

Wieviele Tage bei den einzelnen Versuchstieren (VT) zwischen der Zweittransplantation und der Abstoßung des Zweittransplantates vergingen, zeigt Abb.16 und Tab.2:

Gruppen	A	B	C	D	K
VT 1	7	10	9	10	8
VT 2	8	10	9	8	10
VT 3	11	9	10	11	7
VT 4	8	9	10	12	6
VT 5	7	8	11	9	6
VT 6	9	7	8	10	7
<u>Summe</u> n	8,33	8,83	9,5	10,0	7,33

Tab.2: Lebensdauer der einzelnen Zweittransplantate in Tagen. VT=Versuchstier. In der untersten Zeile die Durchschnittswerte.

Die Anzahl der Tage bis zur Abstoßung der Zweittransplantate im Durchschnitt der einzelnen Grup-

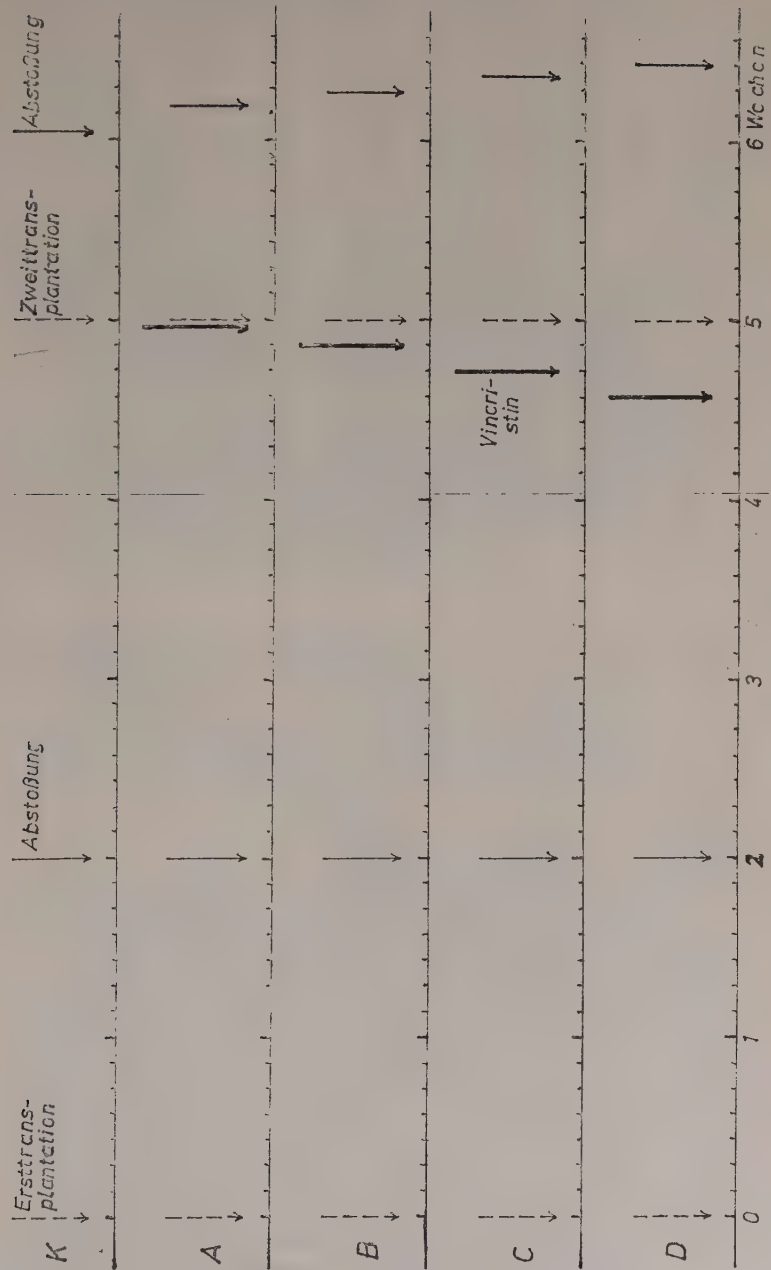


Abb.15:Der Transplantationsversuch in seinem Zeitablauf.

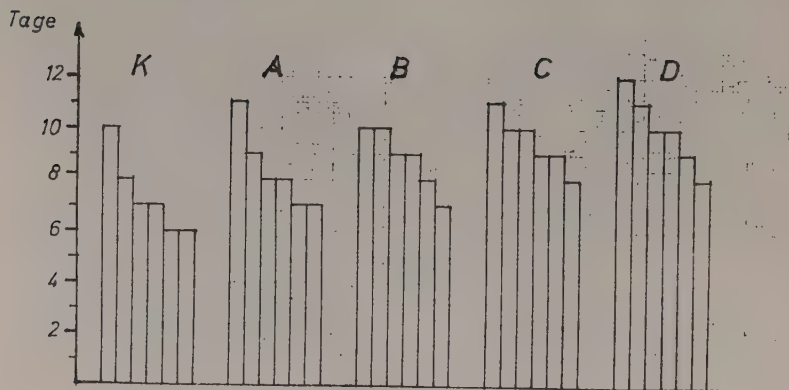


Abb.16: Lebensdauer der einzelnen Transplantate

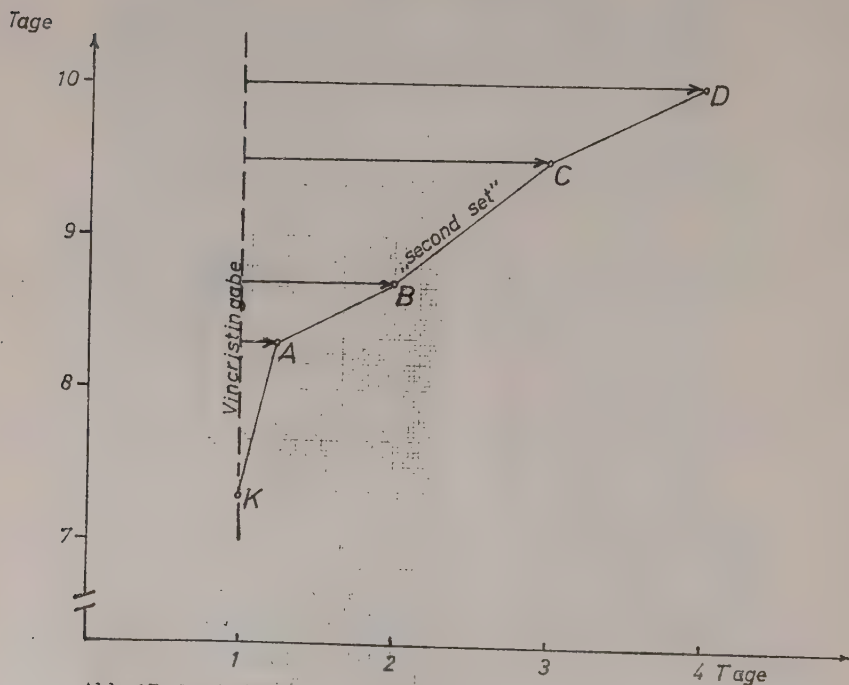


Abb.17: Zweittransplantat-Lebensdauer (Ordinate) im Verhältnis zur Zeitspanne zwischen Vincristingabe und Zweittransplantation (horizontale Pfeile) im Durchschnitt der Gruppen.

pen und die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zeigen Tabelle 3 und Abbildung 17.

Gruppen:	A	B	C	D	K
t	8,33 +2,7	8,83 +1,8	9,50 +1,5	10,0 + 2,0	7,33 +1,7
<u>t</u>	+1,0	+1,5	+2,2	+ 2,7	---
t%	13,5%	20,5%	30%	37%	---

Tab.3:Durchschnittswerte(t)der Lebensdauer der Zweittransplantate bei den einzelnen Gruppen in Tagen,darunter die Streubreiten.In der zweiten Zeile(t)die Differenzen zur Kontrollgruppe in Tagen,in der dritten Zeile(t%)in Prozenten.

Die Abstoßung der Zweittransplantate wurde durch die Vincristingabe eindeutig verzögert,und zwar umso stärker,je früher das Vincristin in dem vorgegebenen Zeitraum von drei Tagen vor der Zweittransplantation gegeben wurde.

II.Immunantwort vom Spättyp

In den auf S.19-21 beschriebenen Versuchen gelang es nicht,bei den verwendeten Mäusen eine spezifische Immunantwort vom Spättyp zu erzeugen.

III.Immunantwort vom Soforttyp

Vor Versuchsbeginn wurde bei vier der in diesem Versuch verwendeten NMRI⁰-Mäuse geprüft,ob mit der passiven Hämagglutinationsreaktion humorale Antikörper gegen E.coli 018-Antigen nachweisbar wären.Ein zufällig vorher stattgefundener Kontakt mit diesem Antigen konnte dadurch weitgehend ausgeschlossen werden.

Die Versuchstiere wurden bei diesem Versuch in zwei große Gruppen unterteilt, die eine (Gruppe A₁ bis A₄) erhielt das Vincristin in verschiedenen Zeitabständen und unterschiedlicher Dosierung vor der Immunisierung mit Coli O 18-Antigen, die andere (Gruppe C bis E) nach der Immunisierung kurz vor der Blutentnahme. Die Tabellen

4 und 5 und die Abbildung 18 zeigen die Zeitabstände und Dosierungen bei den einzelnen Gruppen und den Versuch in seinem Zeitablauf:

Gruppen:	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	B
3 Tage	+				+
2 Tage		+			+
1 Tag			+		+
6 Std.				+	

Tab.4:Die Gruppeneinteilung des ersten Teils der NMRI-Mäuse(Vincristingabe vor der Immunisierung)nach dem Zeitabstand zwischen Immunisierung und Vincristingabe.+=0,150 mg/kg Vincristin i.p.In der linken Randspalte die Zeitabstände bis zur Immunisierung.

Gruppen:	C	D	E
4 Tage	+		
3 Tage		+	
2 Tage		+	
1 Tag		+	+++

Tab.5:Einteilung des zweiten Teils(Vincristin nach der Immunisierung).+=0,150 mg/kg Vincristin i.p.In der linken Randspalte die Zeitabstände zwischen Vincristingabe und Immunisierung.

Es wurden also den Gruppen B und D an je drei aufeinanderfolgenden Tagen je eine Dosis von 0,150 mg/kg verabreicht,der Gruppe Ean einem Tag die dreifache Dosis von 0,450 mg/kg auf einmal.

Die Tabellen 6 und 7 stellen die bei den einzelnen Mäusen gemessenen Antikörpertiter und den Durchschnitt der jeweiligen Gruppen dar; Tabelle 6 zeigt die Gruppen A₁ bis B(s.Tab.4) im Vergleich zur Kontrollgruppe(ohne Vincristin),Tabelle 7 die Gruppen C bis E(s.Tab.5)-ebenfalls im Vergleich zur Kontrollgruppe. In Abbildung 19 sind die Einzel-ergebnisse noch graphisch dargestellt.

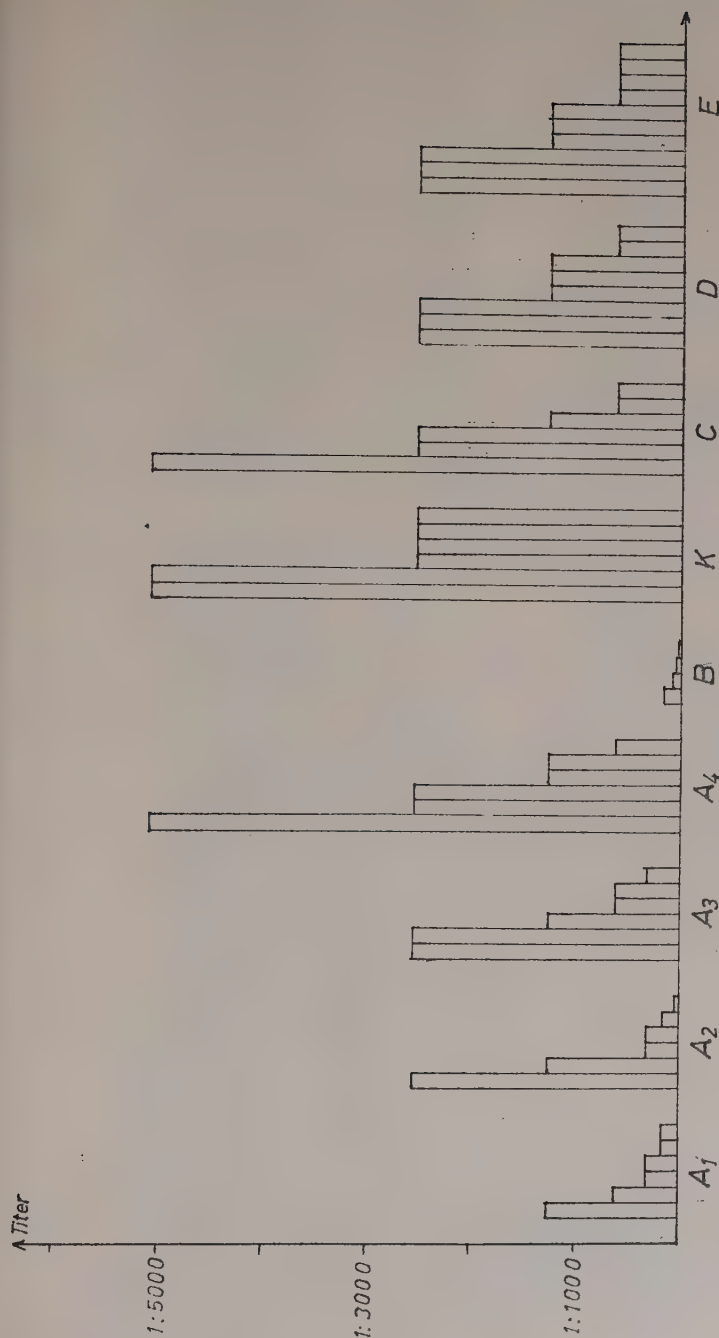


Abb. 19: Die Höhe der humoralen Antikörpertiter gegen E.coli 018 im Einzelnen. Vergleiche auch Abbildung 18 und 20.

Gruppen:	A ₁	A ₂	A ₃
	1: 160	1:2560	1:2560
	1: 640	1: 320	1:1280
	1: 320	1: 40	1:2560
	1: 320	1:1280	1:640
	1:1280	1: 320	1: 320
	1: 160	1: 160	1:640
$\frac{S}{n}$	1: 480	1: 780	1:1333

Gruppen:	A ₄	B	K
	1:2560	1: 40	1:2560
	1:1280	1: 80	1:2560
	1:1280	1: 160	1:2560
	1:2560	1: 20	1:2560
	1:5120		1:5120
	1: 640		1:5120
$\frac{S}{n}$	1:2240	1: 72	1:3430

Tab.6:Die Einzelergebnisse und Durchschnitte der Gruppen, die vor der Immunisierung mit Vincristin behandelt worden waren(s.Tab.4, Abb.18 und 19).Die Kontrollgruppe K erhielt kein Vincristin.

Gruppen:	C	D	E	K
	1: 640	1:1280	1:1280	1:2560
	1: 640	1:2560	1: 640	1:2560
	1:2560	1:2560	1:2560	1:2560
	1:5120	1:2560	1: 640	1:2560
	1:2560	1:1280	1:2560	1:5120
	1:1280	1: 640	1:1280	1:5120
		1:1280	1:1280	
		1: 640	1: 640	
			1:2560	
			1: 640	
$\frac{S}{n}$	1:2133	1:1600	1:1408	1:3430

Tab.7: Die Einzelergebnisse der Gruppen, die nach der Immunisierung-vor der Blutentnahme-mit Vincristin behandelt worden waren(s.Tab.5, Abb.18 und 19).Die Kontrollgruppe K erhält kein Vincristin.S/n=Gruppendurchschnitte.

Bei den Gruppen, die vor der Antigengabe je Versuchstier 0,150 mg/kg Vincristin i.p. erhalten hatten, wurde somit eine ausgeprägte Suppression der humoralen Antikörperbildung gegen das E.coli O 18-Antigen beobachtet, die im Vergleich zur Kontrollgruppe umso stärker war, je größer der Abstand zwischen Vincristingabe und Immunisierung war.

Bei den Tieren der Gruppe B, die mit der dreifachen Vincristindosis (0,450 mg/kg) behandelt worden waren, wurden die mit Abstand niedrigsten Antikörpertiter festgestellt.

In Abbildung 20 werden die durchschnittlichen Titerwerte der Gruppen aus Tabelle 6 in Abhängigkeit zu den jeweils unterschiedlichen Zeiträumen zwischen Vincristingabe und Immunisierung dargestellt. Die sich daraus ergebende Kurve verläuft nicht linear, sondern exponentiell, d.h. die Antikörperbildung wird durch die Vincristingabe umso stärker behindert, je länger die Vincristineinwirkungsdauer vor der Immunisierung ist; die Zunahme dieser Behinderung aber ist umso schneller, je kürzer der Zeitabstand zwischen Vincristingabe und Antigenapplikation ist, mit anderen Worten: die Dauer der Vincristineinwirkung ist bei gleicher Dosierung für den resultierenden humoralen Antikörpertiter von umso größerem Einfluß, je kürzer diese Dauer ist.

Bei den Tieren, die nach der Immunisierung, also ein bis vier Tage vor der Blutentnahme mit unterschiedlichen Vincristindosen behandelt worden waren, wurde ein im Vergleich zu den Gruppen A₁ bis A₃ und B geringer Abfall der gemessenen Antikörpertiter gegenüber der Kontrollgruppe K beobachtet (s. Tab. 7). Am stärksten war er bei Gruppe E ausgeprägt, die einen Tag vor der Blutentnahme eine dreifache Vincristindosis von 0,450 mg/kg erhalten hatte. Bei Gruppe D (0,150 mg/kg Vincristin ein, zwei und drei Tage vor der Blutentnahme) war der Abfall der Titer weniger stark, am geringsten war er bei den Mäusen der Gruppe C (0,150 mg/kg Vincristin vier Tage vor der Blutentnahme).

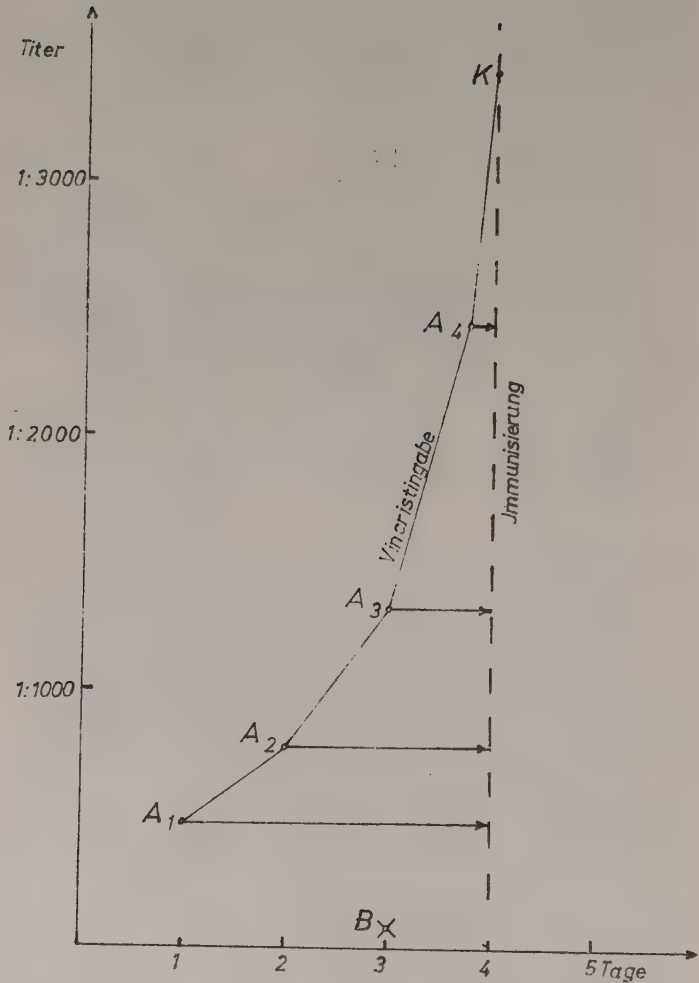


Abb.20: Die durchschnittliche Höhe der Antikörpertiter gegen E.coli O18-Antigen in Abhängigkeit von der Zeitspanne zwischen Vincristingabe und Immunisierung (horizontale Pfeile). Weiteres siehe Text und Tabellen 4 und 5!

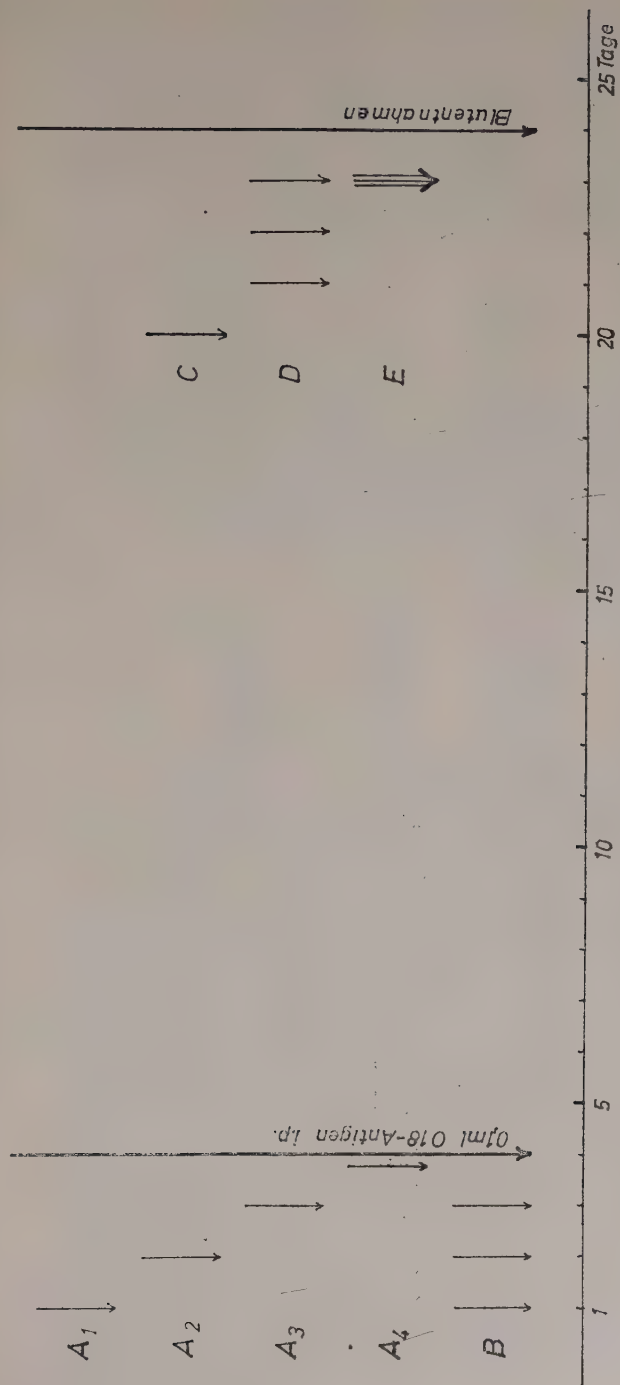


Abb. 18: Der Versuch zur Immunantwort vom Soforttyp in seinem Zeitablauf. Jeder der kleinen Pfeile entspricht einer Gabe von 0,150 mg/kg Vincristin i. p., bei Gruppe E also 0,450 mg/kg auf einmal.

IV. Leukozyten, Thrombozyten und Gewicht

An ausgewachsenen C57/BL-Mäusen wurden an drei bzw. vier Tagen nach und unmittelbar vor Verabreichung von 0,150 mg/kg Vincristin die Leukozyten, die Thrombozyten oder das Gewicht bestimmt. Die folgenden Tabellen 8-10 zeigen die Einzel- und die Durchschnittsergebnisse:

Inj.-Tag	1.Tag	2.Tag	3.Tag
7.300	7.200	+	12.300
8.300	8.200	8.900	13.300
8.800	9.300	10.900	13.600
12.100	12.100	14.800	17.800
12.900	14.300	15.500	18.300
13.800	19.400	20.200	22.200
10.533	11.750	14.060	16.250

Tab.8: Die Leukozytenzahlen unmittelbar vor und 1, 2 und 3 Tage nach der Vincristingabe. In der untersten Zeile die Durchschnittswerte. Bei +) war die Glaskapillare zerbrochen.

Inj.Tag	1.Tag	2.Tag	3.Tag
46.000	28.000	28.000	41.000
58.000	43.000	30.000	48.000
67.000	45.000	33.000	49.000
75.000	+	35.000	58.000
81.000	69.000	36.000	58.000
104.000	72.000	43.000	66.000
71.833	51.400	34.166	53.333

Tab.9: Analog zu Tab.8 die Thrombozytenzahlen.

Inj.Tag	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag
20 g	23 g	23 g	21 g	22 g
24 g	24 g	25 g	23 g	24 g
25 g	25 g	25 g	23 g	24 g
27 g	26 g	26 g	25 g	25 g
27 g	26 g	28 g	25 g	25 g
29 g	27 g	28 g	27 g	28 g
25,3 g	25,2 g	25,8 g	24,0 g	24,7 g

Tab.10: analog zu Tab.8 die Körpergewichte

Im Vergleich zum Ausgangswert stiegen die Durchschnitte der Leukozytenzahlen während des Beobachtungszeitraumes annähernd kontinuierlich um 59% an, die der Thrombozytenzahlen fielen bis zum zweiten Tag um knapp 48% und stiegen am dritten Tag wieder an. Die Gewichte blieben annähernd konstant (s. auch Abbildungen 21-23).

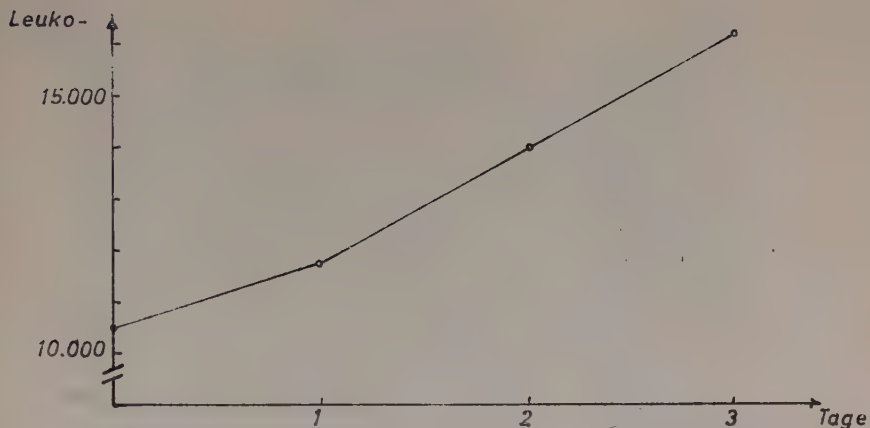


Abb.21:Die Durchschnitte der Leukozytenzahlen unmittelbar vor und ein,zwei und drei Tage nach der Vincristininjektion.

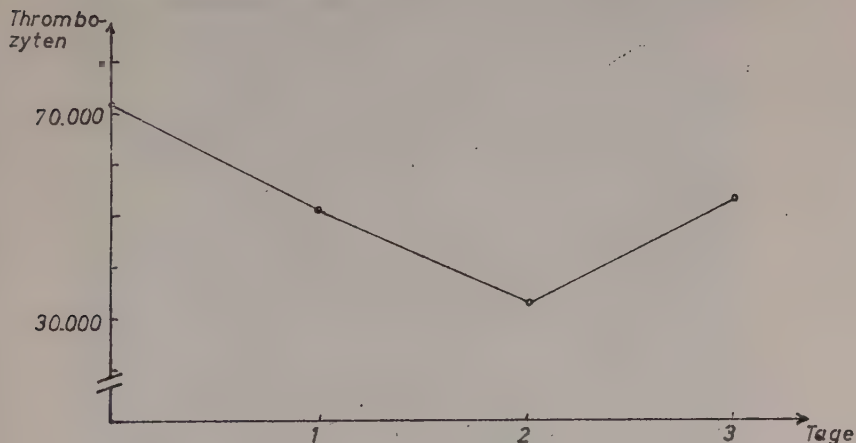


Abb.22:Die Durchschnitte der Thrombozytenzahlen analog zu Abb.21.

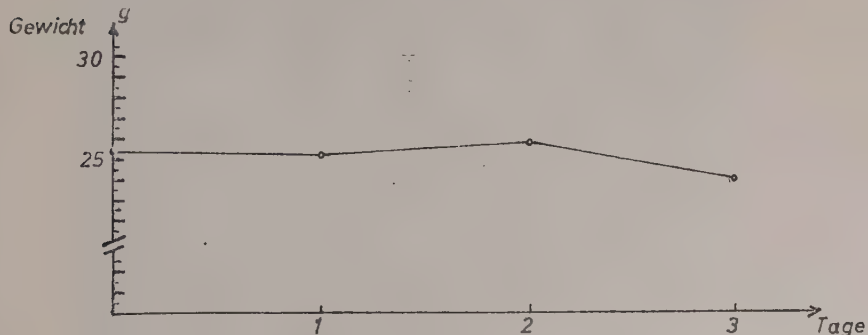


Abb.23:Analog die Durchschnitte der Gewichte.

V.Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Abstoßung von Zweittransplantaten wurde durch eine einmalige Gabe von 0,150 mg/kg Vincristin während der Frist von drei Tagen vor der Zweittransplantation verzögert und zwar umso ausgeprägter, je früher innerhalb dieser drei Tage das Vincristin gegeben wurde. Bei einem Abstand von drei Tagen betrug die Verzögerung 37% der Transplantatlebensdauer bei der unbehandelten Kontrollgruppe(s.S.26f.).

Auch die Bildung von humoralen Antikörpern gegen E.coli 018 wurde durch die Gabe der gleichen Vincristindosis vor der Immunisierung behindert. Dies war ebenfalls umso ausgeprägter, je früher das Zytostatikum gegeben wurde. Bei Injektion drei Tage vor der Immunisierung war der Antikörpertiter im Vergleich zur Kontrollgruppe um 86% erniedrigt, wurde die dreifache Vincristindosis gegeben, sogar um 98%. Das Ausmaß der Suppression ist also zeit- und dosisabhängig(s.S. 29f.).

Wurde den Mäusen 0,450 mg/kg Vincristin 19 Tage nach der Immunisierung gespritzt, resultierte eine Suppression der Antikörpertiter um 59%(s.S.33f.).

Bei der Messung der Leukozyten, der Thrombozyten und des Gewichts ein, zwei und drei Tage nach Gabe von 0,150 mg/kg Vincristin ergaben sich ein Anstieg der Leukozytenzahlen bis zum dritten Tag um durchschnittlich 59%, ein vorübergehendes Absinken der Thrombozyten um durchschnittlich 48% am zweiten Tag und nur unwesentliche Gewichtsschwankungen(s.S.36f.).

D.DISKUSSION

I.Zur Versuchsmethodik

Den Zeitpunkt einer Transplantatabstoßung exakt zu definieren, stellte sich als schwierig heraus. Zwei Methoden werden in der in dieser Arbeit verwendeten Literatur beschrieben. Danach ist ein Hauttransplantat dann abgestoßen, wenn nach dem subjektiven Urteil des jeweiligen Untersuchers 1. die ersten Veränderungen äußerlich sichtbar werden, die zur Abstoßung führen (2), oder wenn 2. das Transplantat im ganzen nekrotisch aussieht (27). Eine ausreichende Objektivierung ist bei diesen Verfahrensweisen unmöglich, insbesondere bei der Beurteilung eines Zweittransplantates im Laufe eines Sekundärphänomens, weil bei diesem keine makroskopisch so gut unterscheidbaren Veränderungen auftreten wie beim Primärphänomen (s. Abb. 3a und 7).

Durch vergleichende Messungen der oberflächlichen Temperaturen des Transplantates und seines Bettes ließe sich vielleicht eine ausreichend genaue Definition des Abstoßungszeitpunktes erhalten. Da die Hauttemperatur wahrscheinlich gut mit der Durchblutungsgröße korreliert, die sich im Verlauf einer Transplantatabstoßung in charakteristischer Weise ändert (53, 55), müßten sich bei regelmäßigen Messungen in kurzfristigen Abständen reproduzierbare Kurven erstellen lassen, die durch histologische Untersuchungen mit den jeweiligen morphologischen Zustandsbildern zu vergleichen wären. Das für solche Messungen nötige, hochempfindliche Hautthermometer stand leider nicht zur Verfügung.

Im Laufe der letzten Phase eines Sekundärphänomens tritt eine völlige Kontinuitätstrennung zwischen Transplantat und Transplantatbett ein. (s. Abb. 4 und 13) Da dies eine auch makroskopisch eindeutig feststellbare Zustandsänderung ist, wurde in dieser Arbeit der Abstoßungszeitpunkt als der Moment definiert, in dem es gelingt, das Transplantat leicht und ohne Zeichen einer frischen Gewebeläsion (Bluttröpfchen) von seinem Bett abzuheben. Befriedigend ist auch diese Me-

thode nicht.

Wie auf S.19f.beschrieben, gelang es nicht, mit DNFB bei den in diesem Versuch verwendeten Mäusen eine spezifische Immunreaktion vom verzögerten Typ zu stimulieren. In der Regel werden zu diesem Zweck Kaninchen, Meerschweinchen oder Ratten mit Erfolg verwendet(2,53,55). Es wäre deshalb nötig gewesen, den Versuch mit einer dieser Tierarten durchzuführen. Da dies im Rahmen dieser Arbeit aus verschiedenen Gründen nicht möglich war, sei auf die auf S.43f.referierten Ergebnisse von AISENBERG und WILKES(2) verwiesen.

II. Zur Antigenität des Wilms-Tumors

Die vorliegende Arbeit fußt auf der Hypothese, daß der Wilms-Tumor, ähnlich wie z.B. das maligne Melanom, das Adenokarzinom des Darmes, das primäre hepatozelluläre Karzinom, verschiedene Sarkome u.a.m.(32), spezifische Antigene besitzt, die ausschließlich gegen die Tumorzellen wirksame humorale und/oder sessile Antikörper stimulieren.

Es würde zu weit führen, im Rahmen dieser Arbeit das Problem der tumorspezifischen Transplantationsantigene(TSTA) beim Wilms-Tumor und der durch diese eventuell provozierten Immunreaktionen ausführlich zu diskutieren. Es sollen deshalb nur einige sich aus dem Literaturstudium ergebenden(bes.53 und 55)grundsätzlichen Überlegungen und die Ergebnisse zweier, in diesem Zusammenhang wichtiger Arbeiten kurz angeführt werden(13,22).

a.SPEZIFISCHE IMMUNTOLERANZ BEIM WILMS-TUMOR?

Es wird angenommen, daß der Wilms-Tumor während der Embryonalzeit aus metanephrogenem Gewebe infolge einer Fehldifferenzierung entsteht(5,22,26,30). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch das relativ häufige Auftreten von Aniridie, Hemihypertrophie und anderen angeborenen Anomalien bei Wilms-Tumorträgern(10).

Das Vorhandensein von TSTA vorausgesetzt, würde

also vor Ausreifung des immunologischen Apparates die Antigenexposition beginnen, d.h. nach der BURNET'schen Theorie müßte sich eine spezifische Immuntoleranz gegen die TSTA entwickeln. Dieser Vorgang ist jedoch, wie die Entdeckung der "low zone"- und der "high zone"-Paralyse gezeigt hat, dosisabhängig, zudem in seinem Ablauf schwer voraussagbar(53), so daß eine Bildung von Antikörpern gegen eventuell vorhandene TSTA beim Wilms-Tumor nicht von vornherein verneint werden kann.

b. EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE

LINDER verglich mittels der Immunodiffusions- und der Immunofluoreszenzmethode unter Verwendung von absorbierten Antiseren die "antigenen Strukturen" von Nephroblastom-, und foetalen und postnatalen Nieren-Geweben(22). Er fand keine tumorspezifischen Antigene, im Gegenteil - es zeigte sich eine fast vollständige Identität der mit diesen Methoden darstellbaren Antigene bei den getesteten Geweben, denn mit Ausnahme des "nierenspezifischen Bürstensaum-Antigens" waren alle für die verschiedenen ausgereiften Nierenbestandteile spezifischen Antigene in den entsprechenden Wilms-Tumor-Geweben nachweisbar.

HELLSTRÖM et al. gelang es dagegen mit Hilfe der "Colony Inhibition"-Technik(CI) sessile Antikörper gegen Wilms-Tumoren bei zwei Patienten nachzuweisen(13). Es wurden Nephroblastomzell-Kulturen zweier Patienten mit autochthonen Lymphozytensuspensionen ebendieser Patienten inkubiert. Im Vergleich zu Kontrollkulturen, die mit Lymphozytensuspensionen von Patienten mit anderen Malignomen, Erkrankungen anderer Art oder von gesunden Probanden inkubiert worden waren, zeigte sich bei ihnen eine starke Behinderung des Tumorzellwachstums. Kulturen von gesunden Hautfibroblasten derselben zwei Wilms-Tumorpatienten wurden durch autochthone Lymphozytensuspensionen in ihrem Wachstum nicht behindert. Die Autoren weisen darauf hin,

daß aus diesen Beobachtungen nicht geschlossen werden kann, ob die beobachteten Immunreaktionen gegen TSTA-hervorgerufen durch Mutation oder Virusinfektion- oder gegen Antigene vom "carci-noembryonalen Typ" gerichtet waren. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß es SMITH et al. gelang, elektronenmikroskopisch in einer 15 Monate lang weitergezüchteten Wilms-Tumor-Zellkultur den Papova-Viren gleichende Viren zu entdecken(36).

III. Zur immunsuppressiven Wirkung v. Vincristin

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verzögerung der Transplantatabstoßungsreaktion durch Vincristinsulfat an Zweittransplantaten beobachtet. An Ersttransplantaten wurde dies von zwei Untersucherguppen studiert, von AISENBERG und WILKES an Inzuchtratten(2) und von RADZIKOWSKI et al. an Mäusen - DBA/2 auf CAF₁ (27). AISENBERG und WILKES erreichten durch die Gabe von 0,2 mg/kg Vincristin täglich für die Dauer von 21 Tagen vom Transplantationstag an im Vergleich zur Kontrolle eine Verlängerung der Transplantatüberlebenszeiten um im Mittel ca. 95% (von 10 auf 19,5 Tage). RADZIKOWSKI et al. gaben unterschiedlich hohe Vincristindosen (i. E.: 0,3 mg/kg; 0,15 mg/kg; 0,75 mg/kg; 0,0375 mg/kg; und 0,01875 mg/kg) täglich für 16 Tage, beginnend am dritten Tag nach den Transplantationen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (14 Tage) konnten sie bei der Dosis von 0,3 mg/kg eine Verzögerung der Abstoßung um durchschnittlich 4 Tage (ca. 29%), bei den Dosen von 0,0375 bis 0,15 mg/kg eine solche um einen Tag (ca. 7%) und bei der Dosis von 0,01875 mg/kg sogar eine Verkürzung der Transplantatüberlebenszeit um einen Tag beobachten. Die Anzahl der Tiere in einer Gruppe betrug fünf.

Bei den eigenen Versuchen betrug die Verzögerung der Zweittransplantatabstoßung bei Gruppe D (0,150 mg/kg drei Tage vor der Zweittransplantation) ca. 37% oder 2,7 Tage (s. S. 29). Im Vergleich zu den eben genannten Ergebnissen

erscheint diese Verzögerung sehr lang, besonders wenn man berücksichtigt, daß bei dem vorliegenden Versuch eine relativ kleine Vincristindosis einmalig bereits sensibilisierten Tieren gegeben wurde. Annähernd gleiche Versuchsbedingungen und die Verwendung von Transplantationssystemen mit ungefähr gleich vielen und gleich starken Antigendifferenzen vorausgesetzt, könnte die Ursache für diese stärkere Behinderung der sekundären Abstoßungsreaktion der frühe Zeitpunkt der Vincristingabe sein (drei Tage vor der Zweittransplantation). Für diese Annahme spricht auch, daß RADZIKOWSKI et al. bei Verabreichung der höheren Vincristindosis von 0,3 mg/kg/die vom dritten Tag nach der Transplantation an eine Verzögerung der primären Abstoßungsreaktion um nur vier Tage (29%) sahen, während AISENBERG und WILKES bei Gabe der niedrigeren Dosis von 0,2 mg/kg/die vom Transplantationstag an eine Verzögerung dieser Reaktion um 9,5 Tage (95%) beobachteten.

Daß der Zeitabstand zwischen Vincristinapplikation und Transplantation die durch das Vincristin bewirkte Behinderung der sekundären Transplantatabstoßungsreaktion in ihrem Ausmaß entscheidend beeinflusst, geht eindeutig aus einem Vergleich der bei den Gruppen A-D und K erzielten Ergebnisse hervor (s.S. 26f.).

Da die Transplantatabstoßungsreaktion zum großen Teil durch kleine (wahrscheinlich thymusabhängige) Lymphozyten bewirkt wird (53,55), wäre es zur Sicherung dieses Ergebnisses wichtig gewesen, den Einfluß des Vincristinsulfats unter gleichen Bedingungen auf eine Immunreaktion vom Spättyp zu beobachten. Dies war im Rahmen dieser Arbeit leider nicht möglich (s.S. 19f. und S. 40).

AISENBERG und WILKES erzeugten durch die Gabe von 0,5 mg bovinem Serumalbumin in 0,1 ml FREUND'schem Adjuvans in eine Fußsohle (1,2) bei männlichen FISCHER-Inzuchtratten eine Immunreaktion vom Spättyp. Bei einer Vincristindosis

von 0,025 und 0,05 mg/kg/die beginnend am Tag der Immunisierung wurde eine leichte bis mittelstarke Unterdrückung der Spättypreaktion beobachtet, eine völlige Anergie gegen das BSA ergab sich bei einer Dosis von 0,1 und 0,2 mg/kg/die während der ersten drei Tage nach der Immunisierung und danach an jedem zweiten Tag. Wurde mit der Vincristingabe erst 21 Tage nach der Immunisierung begonnen, also bei bereits etablierter Reaktionsbereitschaft gegen BSA, so konnte bei einer Dosis von 0,3 mg/kg/die für vier Tage und von 0,150 mg/kg/die für sieben Tage schon drei Tage nach Beginn der Vincristinkur bei der Mehrzahl und nach weiteren zwei Tagen bei allen Versuchstieren eine völlige Anergie gegen BSA beobachtet werden; d.h.: bei den Tieren, die 0,150 mg/kg/die erhielten - bis zum dritten Beobachtungstag also insgesamt 0,450 mg/kg/die - bestand zum Teil bereits eine völlige Anergie gegen BSA. Es kann also mit Sicherheit auch bei einer einmaligen Verabreichung von 0,150 mg/kg mit einer meßbaren Unterdrückung einer bereits etablierten Immunreaktion vom verzögerten Typ gerechnet werden, die analog zu den beim Transplantationsversuch erhaltenen Ergebnissen (s.S. 26ff.) umso stärker sein müßte, je länger das Vincristin innerhalb der Frist von drei Tagen einwirken konnte.

Die bei den Gruppen D und E beobachtete leichte Suppression der humoralen Antikörper durch eine Vincristindosis von jeweils 0,450 mg/kg kurz vor der Entblutung (s.S. 33f.) scheint zunächst nicht glaubhaft zu sein, denn die biologische Halbwertszeit der IgG-Globuline wird mit ca. 20 Tagen angegeben (53, 55). Dieser Befund wird jedoch durch AISENBERG und WILKES bestätigt (2), die an Ratten dasselbe Phänomen beobachten konnten. Sie begannen nach dem Auftreten von hohen, humoralen Antikörpertitern gegen BSA mit der Verabreichung von 0,2 mg/kg/die Vincristin. Nach drei Tagen trat eine Verringerung und nach sieben Tagen ein völliges Verschwinden die-

ser Antikörper ein. Da über den genauen Wirkungsmechanismus des Vincristinsulfates bisher relativ wenig bekannt ist (9, 20, 24, 48-52), bleiben diese Beobachtungen zunächst unerklärlich. Im ersten Teil des Versuchs zur Immunreaktion vom Soforttyp konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß die Suppression der humoralen Antikörper umso ausgeprägter ist, je früher innerhalb eines Zeitraumes von drei Tagen vor der Immunisierung eine einmalige Vincristindosis von 0,150 mg/kg injiziert wird. Es ist also wie beim Transplantationsversuch - das Ausmaß der gemessenen Immunsuppression bei Gabe gleicher Vincristindosen ausschließlich vom Zeitpunkt der Vincristinverabreichung abhängig. Auch hierfür konnte keine Erklärung gefunden werden; da durch therapeutische Vincristindosen weder die Proteinsynthese noch das Wachstum gesunder Zellen wesentlich beeinflusst werden sollen (52), kann nur vermutet werden, daß die immunsuppressive Wirkung dieses Alkaloids durch eine Behinderung von anderen Gliedern in der Kette der zu den Immunreaktionen führenden Abläufe zustande kommt.

IV. Zur Beeinflussung der Leukozyten- und der Thrombozytenzahlen und des Gewichts durch Vincristinsulfat.

Die bei der Beobachtung der Leukozyten- und der Thrombozytenzahlen erzielten Ergebnisse sind wahrscheinlich relativ ungenau. Die tägliche Entnahme von 0,05 bis 0,1 ml Blut stellt für den Mäuseorganismus mit einem Gesamtblutvolumen von 2,0 bis 2,5 ml vermutlich einen so starken Reiz dar, daß allein dadurch eine gewisse Leukozytose und Thrombozytose verursacht werden können.

ROBERTSON und MC CARTHY (28) zählten bei Ratten unmittelbar vor und fünf Tage nach der Injektion von 0,2 mg/kg Vincristin die Leukozyten und die Thrombozyten. Sie sahen keine wesentliche Veränderung der Leukozytenzahlen und einen Anstieg der Thrombozytenzahlen auf knapp das

Doppelte des Ausgangswertes. Dies spricht dafür, daß die im eigenen Versuch beobachtete Leukozytose "blutentnahmebedingt" war, während die leichte Thrombopenie mit Maximum am zweiten Tag und beginnendem Wiederanstieg am dritten Tag nicht recht zu dem von ROBERTSON und MC CARTHY mitgeteilten Ergebnis paßt. Auch unter Berücksichtigung der nur minimalen Gewichtsschwankungen kann zusammenfassend gesagt werden, daß eine einmalige Verabreichung von 0,150 mg/kg Vincristin bei C57/BL/6J/BOM/♂♂-Mäusen wahrscheinlich keine gravierenden Veränderungen im Blutbild und in der globalen Stoffwechselbilanz verursacht.

E.SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, die Beantwortung der Frage zu ermöglichen, zu welchem Zeitpunkt der Beginn einer Chemoprophylaxe mit Vincristinsulfat beim primär operablen Wilms-Tumor am günstigsten wäre. Es wurde von der Vorstellung ausgegangen, daß am besten dann operiert würde, wenn bereits ausreichende Vincristinspiegel mit noch intakten Immunsystemen sich synergistisch ergänzen (s.S.5). Abgesehen vom Verhalten der Tumorzellen selbst müßte das nach den vorliegenden Ergebnissen dann der Fall sein, wenn das Vincristin unmittelbar präoperativ erstmals verabreicht würde, denn sowohl die Abstoßung der Zweittransplantate als auch die Bildung humoraler Antikörper wurde bereits durch eine Vincristingabe sechs Stunden vor der Zweittransplantation, beziehungsweise Immunisierung deutlich behindert.

Wie im folgenden begründet wird, ist diese eindeutige Beantwortung des gestellten Problems leider nicht möglich.

HELLSTRÖM et al.(13) gelang es, die Existenz von sessilen Antikörpern gegen Wilms-Tumoren nachzuweisen. Nach ihrer Ansicht scheint es paradox zu sein, daß die Lymphozyten der Tumorpatienten die autochthonen neoplastischen Zellen zwar in vitro zerstören, beziehungsweise deren Wachstum behindern, es in vivo jedoch trotzdem zur Ausbreitung der Wilms-Tumoren kommt.

Es werden von den Autoren zwei mögliche Erklärungen für diese Befunde genannt: Die eine, daß die Tumoren trotz einer Immunreaktion gegen ihre Antigene in vivo wachsen können, weil diese Immunreaktion zwar viele Tumorzellen zerstören könne, jedoch nicht stark genug sei, den Tumor völlig auszurotten; die andere, daß durch bestimmte Faktoren, wie z.B. durch immunologische Behinderung (Enhancement) bewirkende humorale Antikörper, in vivo die Tumorzellen vor dem zerstörenden Zugriff der Lymphozyten geschützt werden. (s.a. 53 und 55)

Solange nicht geklärt ist, ob es beim Wilms-Tumor ein durch humorale Antikörper bewirktes immunologisches Enhancement der nachgewiesenen sessilen Antikörper gibt, und solange nicht bekannt ist, welche Wirkung durch das Vincristin vergleichsweise stärker beeinträchtigt wird, die Wirkung der hypothetischen, für die Tumorzellen protektiven Antikörper, oder die der zumindest teilweise nachgewiesenen, das Tumorstadium hemmenden Antikörper, solange kann über die Auswirkung der durch das Vincristin hervorgerufenen Immunsuppression auf das Wachstum menschlicher Wilms-Tumoren keine sichere Aussage gemacht werden.

Nur unter Hinweis auf diese Einschränkung kann also auf Grund der in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse vorläufig empfohlen werden, mit der Vincristinbehandlung bei primär operablen Wilms-Tumoren unmittelbar vor Operationsbeginn anzufangen, nicht zuletzt auch deshalb, weil mit der zeitabhängig wachsenden immunsuppressiven Wirkung des Vincristinsulfats auch das Infektionsrisiko entsprechend zunimmt.

Um die Prognose des Wilms-Tumors weiter zu verbessern, muß jedes Kind, bei dem der Verdacht auf diese Krankheit entsteht, mit größter Schnelligkeit, notfallmäßig in das nächstgelegene, zuständige kinderchirurgische Zentrum eingewiesen und dort ebenso diagnostiziert und behandelt werden, denn es muß damit gerechnet werden, daß eine vermehrte Zellaussaat des Tumors und damit eine erhöhte Metastasierungsgefahr nicht erst während der Operation sondern schon mit der ersten diagnostischen Palpation einsetzt.

F.ZUSAMMENFASSUNG

In der Therapie des Wilms-Tumors hat sich die Anwendung von Zytostatika (Actinomycin D und Vincristinsulfat) zur Prophylaxe der iatrogenen Metastasierung weitgehend durchgesetzt. Es stellt sich die Frage, ob nicht durch die ausgeprägte immunsuppressive Wirkung in unserem Falle des Vincristinsulfats die Immunsysteme - und damit die körpereigene Tumorabwehr - bei frühzeitigem Verabreichungsbeginn soweit beeinträchtigt würden, daß zum Zeitpunkt der größten Metastasierungsgefahr, nämlich während der Operation, der protektive Wert der Vincristingabe gemindert, wenn nicht gar aufgehoben würde.

Es wurde deshalb an Mäusen die immunsuppressive Wirkung des Vincristins anhand der Transplantatabstoßungsreaktion und der Immunreaktion vom Soforttyp in Abhängigkeit von der Einwirkungs-dauer drei Tage lang beobachtet. Es ergab sich folgendes:

1. Die Abstoßung von Zweittransplantaten wurde deutlich verzögert und zwar umso stärker, je früher das Vincristin in einer Dosis von 0,150 mg/kg den Mäusen vor der Zweittransplantation gespritzt worden war.
2. Die Bildung von humoralen Antikörpern gegen E.coli 018 wurde durch die gleiche Vincristindosis stark supprimiert, auch hier umso stärker, je früher es innerhalb von drei Tagen vor der Immunisierung gegeben wurde.
3. Die Beobachtung der Leukozyten, der Thrombozyten und des Gewichts während drei Tagen nach dieser Vincristindosis ergab mit Ausnahme einer leichten, reversiblen Thrombopenie keinen verwertbaren Befund.

Wenn auch über die Pathogenese der Metastasierung beim Wilms-Tumor noch nicht genug bekannt ist, und deshalb sichere Aussagen über die Vincristinwirkung auf diese noch nicht möglich sind, so ist es auf Grund dieser Ergebnisse wahrscheinlich doch am Besten, bei primär operablen Wilms-Tumoren unmittelbar vor der Operation mit der

Vincristintherapie zu beginnen, da nur dann ein optimaler Synergismus der Immunsysteme und des Zytostatikums während der Zeit der größten Metastasierungsgefahr erwartet werden kann.

Die Frage der Immunogenität der Wilms-Tumoren wurde anhand der zitierten Literatur diskutiert.

G.LITERATURVERZEICHNIS

1. AISENBERG, A.C.: Suppression of Immune Response by Vincristine and Vinblastine
Nature, 200:484 (1963)
2. AISENBERG, A.C. und B. MILKES: Studies on the Suppression of Immune Responses by the Periwinkle Alkaloids Vincristine and Vinblastine
J. of Clin. Invest., 43:2394-403 (1964)
3. BURGERT, F.O. und O. GLIDWELL: Dactinomycin in Wilms' Tumor
JAMA, 199:464-8 (1967)
4. CLATWORTHY, H.W.: Wilms'-Tumor (A Current Plan of Treatment)
Ohio State Med. J., 65:374-6 (1969)
5. COERDT, I.: Urologie im Kindesalter
Der Landarzt, Heft 17:738-43 (1966)
6. ECKLER, E. et al.: Zur Behandlung von Wilms-Tumoren
Z. f. Kinderchirurgie u. Grenzgeb., 4: Heft 2, 3-24 (1967)
7. FARBER, S.: Chemotherapy in the Treatment of Leukemia and Wilms'-Tumor
JAMA, 198:826-36 (1966)
8. FERNBACH, D.J. und D.T. MARTYN: Role of Dactinomycin in the improved Survival of Children With Wilms'-Tumor
JAMA, 195:1005-9 (1966)
9. FINE, R.N. et al.: Hyponatremia and Vincristine Therapy
Am. J. of Dis. of Children, 112:256-9 (1966)
10. FRAUMENI, J.F. und A.G. GLASS: Wilms'-Tumor and Congenital Aniridia
JAMA, 206:825-8 (1968)
11. GEORGE, P. u. D.H. JAMES: Vincristine in Childhood Cancer
Proc. of South. Soc. f. Ped. Res., 56:1439 (1963)
12. GRAAFLAND, A.B.J.: Leurocristine, een nieuw chemotherapeutikum, toegepast tegen wilms'-tumor
Ned. T. Geneesk., 108: II 1844-7 (1964)
13. HELLSTRÖM, I. et al.: Cellular and Humoral Immunity to Different Types of Human Neoplasms
Nature, 220:1352-4 (1968)
14. JAMES, D.H. u. P. GEORGE: Vincristine in Children with Malignant Solid Tumors
J. of Pediatrics, 64:534-41 (1964)
15. JAMES, D.H. et al.: Childhood Malignant Tumors (Concurrent Chemotherapy with Dactinomycin and Vincristinesulfate)
JAMA, 197:1043-5 (1966)

- 16.KARRER,K.:Grundsätzliches über die Therapie von Malignomen mit Zytostatika
Pädiatrie und Pädologie,5: 127-40 (1969)
- 17.KEIDAN,S.E.:Tumor Chemotherapy in Children
Brit.J.of Clin.Practice,19: 351-61 (1965)
- 18.KIRKLAND,J.S.et al.:Seminar on Chemotherapy for Malignant Tumors in Childhood
Arch.of Dis.in Childhood,41: 155-7 (1966)
- 19.LAMPERT,F.:Die Chemotherapie der "Krebskrankheiten" im Kindesalter
Therapiewoche,17: 1070-5 (1967)
- 20.LAMPERT,F.:Die Wirkung von Vincristin auf das menschliche Knochenmark
Dtsch.med.Wochenschrift,92: 1564-8 (1967)
- 21.LANG,N.:Immunologie des Karzinoms als Grundlage therapeutischer Überlegungen
Med.Welt,14: 2538-45 (1963)
- 22.LINDER,E.:The Antigenic Structure of Nephroblastomas
Int.J.of Cancer,4:232-47 (1969)
- 23.NITSCHKE,R.et al.:Behandlung von Wilmstumoren
Dtsch.Röntgenkongreß 1967, Teil B (Sonderbände zur Strahlentherapie, Bd.66) S.1-7
- 24.PLÜSS,H.u.W.H.HITZIG:Die Wirkung von Vincristinsulfat auf die Erythropoese
Schweizer.Med.Wochenschrift,97: 1476-7 (1967)
- 25.OEHME,J.:Nachbehandlung u.Überwachung maligner Abdominaltumoren im Kindesalter
Dtsch.med.Wochenschr.,91: 1459-60 (1966)
- 26.OLSEN,B.S.et al.:Wims'-Tumor in an adult
Cancer,25: 21-5 (1970)
- 27.RADZIKOWSKI,C.et al.:The Influence of Leurocristine on Transplantation Immunity
Cancer Chemotherapy Rep.,32: 15-8 (1963)
- 28.ROBERTSON,J.H.u.G.M.MC CARTHY:Periwinkle Alkaloids and the Platelet-Count
Lancet,283: 353-5 (1969)
- 29.RUBIN,P.et al.:The Significance of Scoliosis in Post-irradiates Wilms'-Tumor and Neuroblastoma
Radiology,79: 539-58 (1962)
- 30.RUBIN,P.et al.:Cancer of the Urogenital Tract:Wilms'-Tumor and Neuroblastoma(Wilms'-Tumor)
JAMA,204: 981-90 (1968)
- 31.SAGERMAN,R.H.et al.:Vortrag geh.auf dem "Meeting of the Amer.Radium Soc.1969" in Philadelphia, ref.u.d. Titel: "Surgery, Drugs appear best for Wilms' " in JAMA,208: 1110 (1969)
- 32.SCHEURLIN,P.G.:Immunolog.Aspekte bösartiger Tumoren
Med.Welt,22: 1257-61 (1971)

- 33.SELAWRY,O.S.et al.:Effect of Vincristine on Malignant Solid Tumors in Children
Cancer Chemother.Rep.,52: 497-500 (1968)
- 34.SIROLA,K.:Vortrag geh.auf dem "Meeting of the Scand. Ass.of Ped.Surgeons" am 29.9.-1.10.1967:
The Treatment of Wilms'-Tumor and the Results (100 Fälle),ref.in:
Acta Paed.Scand.;57: 361-6 (1968)
- 35.SMITH,J.C.u.R.P.BOLANDER:Radiation and Drug Induced Hyalinization of the Stomach
Arch.of Pathology,19: 310-6 (1965)
- 36.SMITH,J.W.et al.:Detection of a Small Virus in a Cultivated Human Wilms'-Tumor
Cancer,24: 527-31 (1969)
- 37.STEIN,J.J.:Management of Patients with Wilms'-Tumor
Texas Medicine,63: 78-81 (1967)
- 38.SUKAROCHANA,K.u.W.B.KIESEWETTER:Wilms'-Tumor:Factors influencing long-term survival
J.of Pediatrics,69: 747-52 (1966)
- 39.SULLIVAN,MP.:Vincristine Therapy for Wilms'-Tumor
Cancer Chemotherapy Rep.,52: 481-4 (1968)
- 40.SULLIVAN,M.P.et al.:Vincristine Sulfate in Management of Wilms'-Tumor
JAMA,202: 382-4 (1967)
- 41.SULLIVAN,M.P.et al.:Replacement of Preoperative Irradiation by Vincristine Chemotherapy in Wilms'-Tumor(ref.)
Proc.of the Amer.Ass.for Cancer Res.,8: 65 (1967)
- 42.SUTOW,W.W.:Effective Chemotherapy in Children with Wilms'-Tumor
South.Med.J.,60: 254-6 (1967)
- 43.SUTOW,W.W.u.SULLIVAN,M.P.:Vincristine in Primary Treatment of Wilms'-Tumor
Texas State J.of Med.,61: 794-9 (1965)
- 44.SUTOW,W.W.:Chemotherapy in Childhood Cancer(except Leukemia)
Cancer,18: 1585-9 (1965)
- 45.SUTOW,W.W.et al.:Vincristine(Leurocristine)Sulfate in the Treatment of Children with Metastatic Wilms'-Tumor
Pediatrics,32: 880-7 (1963)
- 46.VAHLENSIECK,W.u.ST.GÖMBE:Diagnostik,Therapie u.Prognose von Wilms'-Tumoren
Med.Welt,16: 1850-2 (1965)
- 47.VIETTI,T.J.et al.:Vincristine Sulfate and Radiation-Therapy in Metastatic Wilms'-Tumor
Cancer,25: 12-20 (1970)
- 48.WAGNER,E.K.u.B.ROIZMAN:Effect of the Vinca Alkaloids on RNA-Synthesis in Human Cells in vitro
Science,162: 569-70 (1968)

49. WARNECKE, P. u. S. SEEBER: Angriffspunkte von Vinca-Alkaloiden im Protein- und Nucleinsäurestoffwechsel leukämischer Rinderlymphozyten in vitro
Z. Krebsforschung, 73: 67-74 (1969)
50. WARNECKE, P. u. S. SEEBER: Angriffspunkte von Vinca-Alkaloiden im Protein- und Nucleinsäurestoffwechsel
Z. Krebsforschung, 71: 361-7 (1968)
51. ohne Verfasser: Vincristine Sulfate (Oncovin)
JAMA, 191: 751-2 (1965)

Lehrbücher und Monographien

52. CALABRESI, P. u. R. E. PARKS: Chemotherapy of Neoplastic Diseases, aus
GOODMAN, D. S. u. A. GILMAN: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 4th edition, Macmillan,
London, New York, Toronto 1970
53. HUMPHREY, J. H. u. R. G. WHITE: Kurzes Lehrbuch der Immunologie (Herausgeber E. MACHER)
Thieme, Stuttgart 1971
54. LAMPERT, F.: KREBS im Kindesalter, Leitfaden der pädiatrischen Onkologie
Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1970
55. STEFFEN, C.: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie sowie ihre klinische Anwendung
Thieme, Stuttgart 1968

LEBENS LAUF

Ich, C h r i s t i a n Eberhard Georg G ö p f e r t wurde am 23.4.1943 in Göppingen/Württemberg als dritter Sohn des Verlagslektors Dr.phil.Herbert Georg Göpfert und dessen Ehefrau Hildegard, geb.Klai-ber, geboren. Die ersten Jahre meiner Kindheit verlebte ich in Gräfelfing/München, wo ich 1949 eingeschult wurde.

Ab 1953 besuchte ich die Oberschule, zuletzt 1960 das Realgymnasium Uffenheim/Mfr. Von 1960-62 erlern-te ich das Schreinerhandwerk in Rummelsberg/Nürnberg. 1962 bestand ich die Aufnahmeprüfung am Münchenkol-leg, wo ich 1965 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester folgte 1965 die Immatrikulation an der Medizinischen Fakultät der Universität zu München; 1966 Vorphysikum, 1968 Physikum und 1970 Staatsexamen. Ab Dezember 1970 leistete ich meine Medizinalassistentenzeit auf den internen, chirur-gischen und gynäkologischen Stationen des Kreis-krankenhauses Schongau/Lech ab. In der ersten Jah-reshälfte 1972 wurde ich zu einer Wehrübung eingezo-gen. Ab Juli 1972 arbeitete ich als Assistent an der Pädiatrischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Starn-berg/See, ab Januar 1973 an der Chirurgischen Klinik St.Theodul in Zermatt/Schweiz. Dreimal war ich bisher als Vertreter eines Allgemeinarztes in einer Land-praxis tätig (jeweils einen Monat).

Die Doktorarbeit habe ich im Sommer 1968 begonnen, die experimentellen Arbeiten dauerten bis Mitte 1970.

Als Nächstes möchte ich für ein Jahr in einem pa-thologischen Institut arbeiten. Anschließend werde ich voraussichtlich die Fachausbildung zum Chirur-gen durchlaufen.

